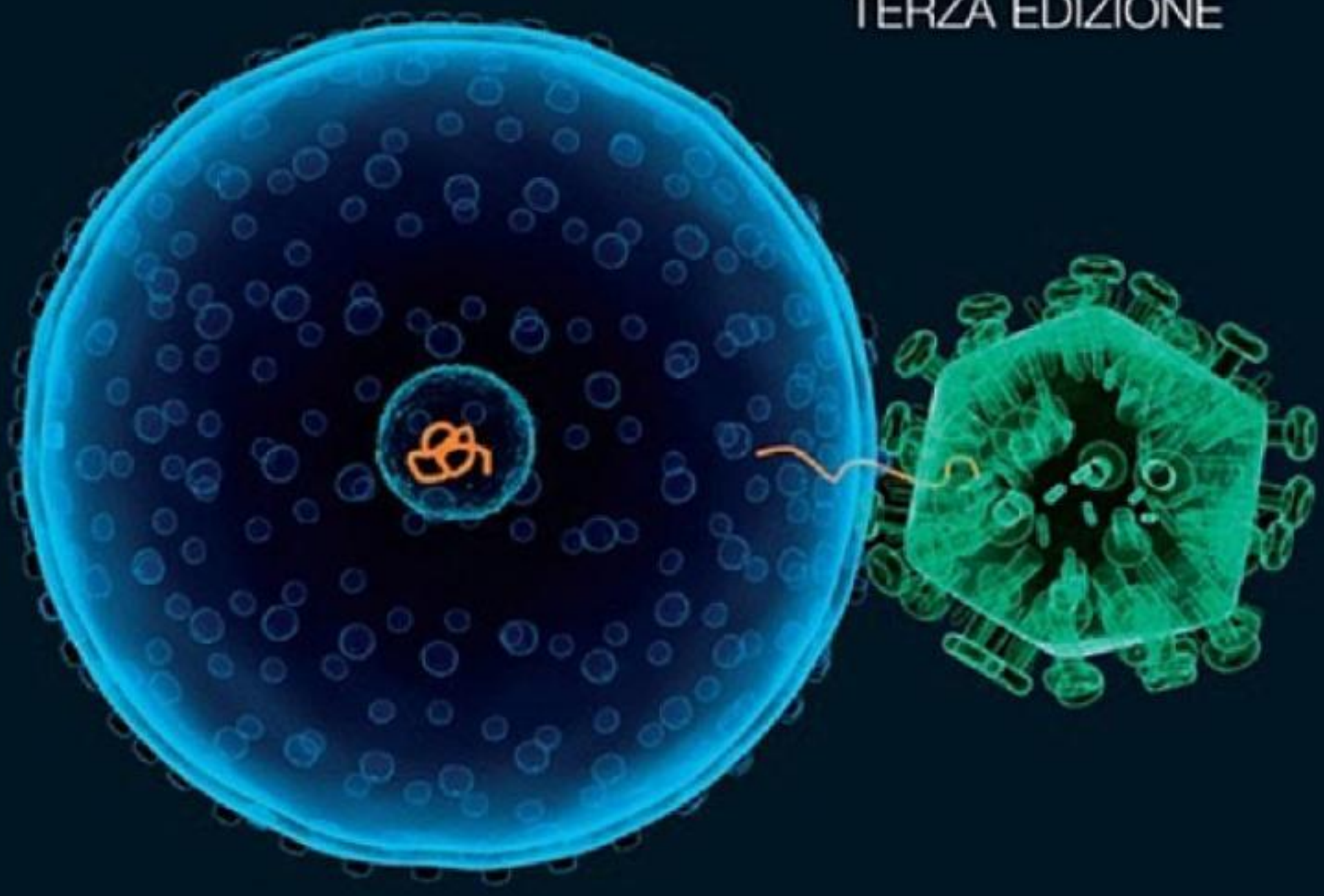
Giorgio Bartolozzi

Vaccini e vaccinazioni

TERZA EDIZIONE



Materiale protetto da copyright

Capitolo 1

I vaccini

Le molteplici innovazioni tecnologiche degli ultimi decenni hanno permesso di ottenere vaccini nuovi molto più sicuri ed efficaci di quanto non fosse possibile nel passato.

I moderni vaccini sono costituiti essenzialmente da proteine purificate: essi non contengono più, come avveniva nel passato, sostanze "contaminanti" molto reattogene e prive di potere immunogeno. Controlli di qualità, sempre più approfonditi, hanno contribuito in modo straordinario alla sicurezza dei vaccini.

Relativamente recente è la convinzione della necessità di estendere la pratica vaccinale ai Paesi in via di sviluppo: l'EPI (*Expanded Program on Immunization*), qualche decennio fa, ha iniziato la sua attività con un grande programma di vaccinazione per tutti i bambini del mondo, nei confronti di tre malattie: tetano (soprattutto neonatale), difterite e poliomielite. Oggi questa

Materiale protetto da copyright

attività è svolta dal GAVI (*Global Alliance for Vaccine and Immunization*), erede dell'EPI, che riunisce i principali attori pubblici e privati nel campo delle vaccinazioni. Si trovano fra i suoi membri: governi donatori, fra i quali l'Italia, i Paesi poveri, l'Organizzazione Mondiale della Sanità, l'UNICEF, la Banca Mondiale, i produttori di vaccini dei Paesi industrializzati e di quelli in via di sviluppo, istituzioni tecniche e di ricerca, la Fondazione Bill & Melinda Gates, oltre a personalità autorevoli, che si sono distinte per la loro attività filantropica, come la Regina di Giordania e altri. Grazie a queste attività sono stati vaccinati nei Paesi in via di sviluppo 250 milioni di bambini e sono state evitate 4 milioni di morti (Mantovani A, 2009).

Storia delle vaccinazioni

La scienza dei vaccini è stata creata nel 1796 da Jenner con la dimostrazione che si poteva prevenire il vaiolo umano, utilizzando un virus del vaiolo meno virulento (quello del vaiolo bovino). Da allora sono passati oltre duecento anni, durante i quali la vaccinazione contro il vaiolo ha condotto all'eradicazione della malattia (1977).

È stato l'8 maggio 1980, che la 33ª

Materiale protetto da copyright

Assemblea Mondiale della Sanità, riunita a Ginevra annunciò che "tutti i popoli del mondo erano stati completamente liberati dal vaiolo": questa data sarà ricordata come un evento fondamentale nella storia dell'uomo e della medicina. L'ultimo caso di vaiolo era stato riscontrato a Merca, in Somalia, il 26 ottobre 1977 in un giovane di 23 anni, Alì Maow Maalin, cuoco dell'ospedale locale, che aveva presentato un vaiolo minore (Alastrim). Il vaiolo è stato la prima, e per ora l'unica malattia, per la quale è stato raggiunto l'obiettivo finale, cioè l'**eradicazione**, grazie alla vaccinazione: molte condizioni favorenti (la mancanza di serbatoi umani o animali, l'uniformità e il facile riconoscimento del quadro clinico, e l'assenza di forme asintomatiche) hanno concorso al raggiungimento del successo (Signorini LF et al, 1995).

Oggi le due ultime riserve di virus del vaiolo sono nei laboratori di Atlanta, negli Stati Uniti, e di Koltsovo in Russia. Il Consiglio esecutivo dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha stabilito la soppressione anche di queste due ultime riserve di virus del vaiolo umano, per evitare che un'eventuale fuga di virus dai laboratori possa costituire un grave rischio per tutta la popolazione del mondo, ma la distruzione definitiva è stata rimandata. L'OMS dovrà

Materiale protetto da copyright

verificare ogni 5 anni lo stato di conservazione e le garanzie di sicurezza dei laboratori nei quali il virus viene conservato. Il dottor Philippe Stroot, portavoce dell'OMS, ha affermato che "la loro distruzione costituirà la prima eliminazione, deliberata, di una specie dalla Terra".

A poco meno di un secolo dalla scoperta di Jenner, nell'aprile 1880 Louis Pasteur (1822–1895), un altro grande padre delle vaccinazioni, commentando davanti ai membri dell'Accademia francese delle Scienze di Parigi i propri esperimenti, affermò:

> *"Il colera dei polli è prodotto da un parassita microscopico* [oggi chiamato *Pasteurella multocida*]*: un virus attenuato* [Pasteur usa la parola virus nel senso più antico] *che, con una o più inoculazioni può difendere gli animali dagli effetti mortali dell'inoculazione".*
> "*Noi possediamo ora il vaccino contro il carbonchio, capace di prevenire la malattia mortale, senza essere*

La storia della vaccinazione contro il vaiolo

La fama di scopritore del vaccino contro il vaiolo viene oggi giustamente attribuita a Edward Jenner, che per primo usò materiale prelevato da una pustola del vaiolo bovino

Materiale protetto da copyright

per difendere la popolazione dal virus del vaiolo umano. La storia della prima vaccinazione è ben conosciuta: era successo che una mungitrice, Sarah Nelmes, fosse stata infettata nel maggio 1796 da una mucca, affetta da vaiolo bovino, manifestando un'unica pustola su una mano. Jenner decise di utilizzare il pus prelevato dalla lesione della ragazza per inocularlo, mediante due scarificazioni, nel braccio di un bambino di 8 anni, James Phipps. Era il 14 maggio 1796. Anche il bambino mostrò due sole pustole nelle sedi della scarificazione, insieme a un leggero stato di malessere generale. Ai primi del luglio successivo Jenner inoculò nel bambino materiale proveniente da un paziente affetto da vaiolo umano (il consenso informato e le leggi della bioetica erano di là da venire) e il nuovo "innesto" non ebbe, fortunatamente per il piccolo James, alcuna conseguenza.

I tempi erano maturi per una scoperta del genere, perché ormai dai primi decenni del '700 era stata importata in Europa la pratica dell'innesto a partire da pustole di vaiolo umano, prima di ogni altro a opera di Lady Mary Wortley Montagu (1689–1742), una nobildonna letterata inglese che nel 1715 aveva contratto il vaiolo e ne era rimasta

Materiale protetto da copyright

irrimediabilmente deturpata (Radetsky M, 1999). Durante la parte centrale del XVII secolo fu riconosciuto che l'innesto produce nella maggior parte dei casi un vaiolo discreto e benigno, anche se la letalità per questa pratica venne valutata in un decesso ogni 450 inoculati, una letalità troppo alta per una misura preventiva (Manetti S, 1761). Merita riportare una riflessione dello stesso S. Manetti: "*non sta al medico insistere* [per la vaccinazione], *perché, se muore un ragazzo innestato in seguito al consiglio stato dato, riguarderanno il medico come autore della lor perdita. Trenta e quaranta per cento, che vadano a perire di vajolo spontaneo, non nuocono alla fama del medico, quanto un solo che muoia di vaiolo artificiale anche fra mille inoculati, se sottoposto all'operazione per consiglio di esso*".

La morbosità e la letalità per vaiolo raggiungevano d'altra parte nel '700 livelli elevatissimi, anche nel nostro Paese. La metà dei nati e forse più era in quell'epoca destinata ad ammalarsi di vaiolo nel corso della vita, un quinto soccombeva alla malattia (la letalità era quindi del 20%), cioè quasi un decimo di ogni generazione (Assael B, 1995; Signorini LF et al, 1995).

A dir la verità già prima di Jenner molti medici avevano riconosciuto la benignità del

Materiale protetto da copyright

vaiolo delle mucche (*cow-pox*) in confronto al vaiolo umano (*small-pox*); ma "*l'idea di inocularlo nei suscettibili va riservata a Jenner*" (Commissione Medica della Repubblica Cisalpina, 1802). "*Il merito non consiste nel vedere il fenomeno, ma nel cavarne costrutto, scoprendone le relazioni*" (Sacco L, 1809; Sacco L, 1809a).

Solo 3 anni dopo la prima vaccinazione di Jenner, più di 100.000 persone erano state sottoposte alla vaccinazione nel Regno Unito; dai primi anni dell'800 il vaccino venne introdotto in altri Paesi europei, in America, in Asia e in Africa, spesso usando le lesioni pustolose dei bambino con il contatto braccio-braccio, in successione.

esso stesso mortale, coltivabile a volontà, trasportabile ovunque senza che si alteri, preparato infine con un metodo che penso sia suscettibile di generalizzazione, poiché, già una prima volta esso è servito per trovare il vaccino contro il colera dei polli. Per le caratteristiche delle condizioni sopra ricordate e sottolineando solo gli aspetti scientifici, la ***scoperta del vaccino contro il carbonchio costituisce un progresso sensibile sul vaccino jenneriano, perché quest'ultimo non è stato ottenuto sperimentalmente****."*

Materiale protetto da copyright

Pasteur concluse: *"Permettetemi di usare la parola 'vaccinazione' per esprimere l'atto di inoculare un pollo con il virus attenuato"*.

Fu da quel momento che la parola "vaccino" ha abbandonato il concetto di "vaiolo vaccino" per assumere un significato più largo e più moderno.

Le scoperte di Jenner e di Pasteur rappresentano due pietre miliari nel campo delle vaccinazioni: la prima, anche per il tempo in cui venne fatta, di tipo eminentemente empirico-pratico e la seconda, più moderna, con i caratteri scientifico-sperimentali, tipici della medicina di oggi. Le idee di Pasteur hanno trovato nel nostro secolo infiniti campi di applicazione, fino a portare alla scoperta di un numero elevatissimo di vaccini diretti contro malattie di origine virale e batterica. Oggi, anche grazie agli antibiotici e al miglioramento delle condizioni igieniche delle popolazioni, il numero delle morti per malattie infettive si è ridotto di molte decine di volte, in confronto a quanto avveniva nei primi decenni del XX secolo (Hilleman MR, 1998).

Al giorno d'oggi la vaccinologia, cioè la scienza che studia i vaccini, è una mescolanza di microbiologia, virologia, biologia molecolare e immunologia allo scopo di ottenere soluzioni pratiche per la prevenzione della malattie infettive. La vaccinologia comprende non solo lo

Materiale protetto da copyright

sviluppo dei vaccini, ma anche il loro uso e il loro effetto benefico sulla salute pubblica.

A ben riflettere, *l'uomo non ha mai avuto a disposizione armi preventive più efficaci delle vaccinazioni.*

Negli ultimi 30 anni la preparazione di nuovi vaccini ha avuto un crescendo imponente, per cui è stato allestito un nuovo vaccino ogni anno (dal 1991 al 2010, 20 vaccini in 20 anni) (*figura 1.1*).

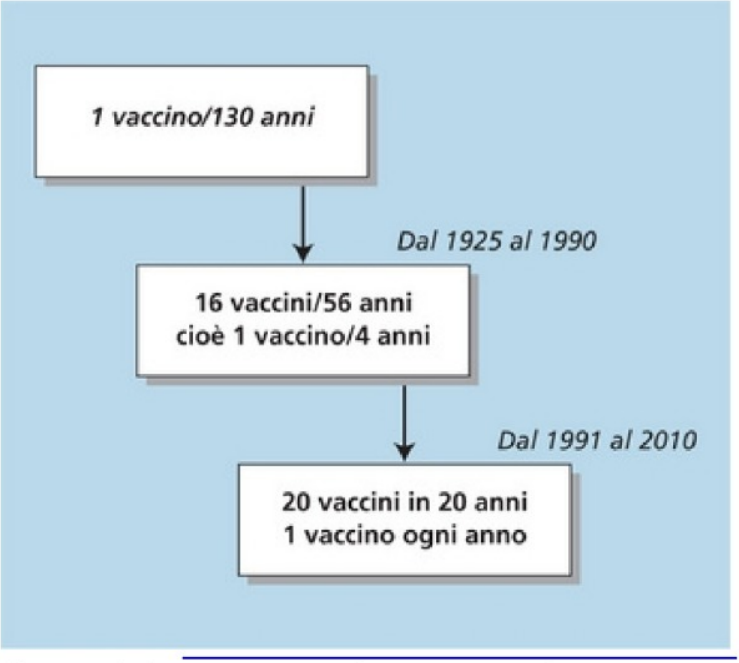


Figura 1.1 Incremento dei vaccini in duecento anni

Metodi classici e nuovi metodi per la

Materiale protetto da copyright

Parker SK, Consultation, Geneva 15–16 april 2002. *Vaccine*. 2004;22:1836–1841.

Kumagai T., Ozaki T., Kamada M. Gelatin-containing diphtheria-tetanus-pertussis (DTP) vaccine causes sensitisation to gelatin in the recipients. *Vaccine*. 2000;18:1555–1561.

Kumagai T., Ozaki T., Kamada M., et al. Gelatin-containing diphtheria-tetanus-pertussis (DTP) vaccine causes sensitisation to gelatin in the recipients. *Vaccine*. 2000;18:1555–1561.

Kumagai T., Yamanaka T., Wataya Y., et al. A strong association between HLA-DR9 and gelatin allergy in the Japanese population. *Vaccine*. 2001;19:3273–3276.

Lang J., Wood S.C. Development of orphan vaccines: an industry. *Emerg Infect Dis*. 1999;5:749–756.

Lau G.K., Lok A.S., Liang R.H., et al. Clearance of hepatitis B antigen after bone marrow transplantation: role of adoptive immunity transfer. *Hepatology*. 1997;25:1497–1501.

Lindberg A.A. Glycoprotein conjugate vaccines. *Vaccine*. 1999;17:S28–S36.

Lockhart S. Conjugate vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2003;2:633–648.

Lunelli A., Pugliese A. Pianificare le strategie vaccinali con l'aiuto della matematica. *Giorn Vacc*. 2010;2(fasc. 1):2–6.

Macchiaiolo M. NNT e dintorni: proviamo a semplificare. *RIAP*. 2008;22(fasc. 5):28–30.

Madsen K.M., Lauritsen M.B., Pedersen C.B., et al. Thimerosal and the occurrence of autism: negative ecological evidence from Danish population-based data. *Pediatrics*. 2003;112:604–606.

Materiale protetto da copyright

preparazione di un vaccino

Dal tempo di Pasteur fino a oggi vi sono fondamentalmente tre metodiche per preparare un vaccino:

- l'attenuazione
- l'inattivazione
- la sintesi, mediante la tecnica DNA ricombinante.

Per ottenere l'**attenuazione** dell'agente infettivo inizialmente è stato usato il calore, l'ossigenazione, gli agenti chimici e l'invecchiamento; successivamente è stato usato il passaggio sull'animale e sull'uovo embrionato di pollo, la crescita alle basse temperature (virus attenuato dell'influenza) e l'induzione dell'autotrofia (*Salmonella typhi* Ty21a).

Per alcuni virus (influenza e rotavirus) sono state usate anche metodiche di riarrangiamento genico, combinando materiale genico di virus patogeni con geni di virus, caratterizzati da un comportamento attenuato. Le metodiche di riarrangiamento genico si sono dimostrate essenziali anche per la preparazione di vaccini uccisi (inattivati) contro l'influenza.

La seconda strategia per ottenere un vaccino efficace è quella dell'**inattivazione**. Già alla

Materiale protetto da copyright

fine del XIX secolo è stato dimostrato che l'agente infettivo intero può essere ucciso senza che esso perda l'immunogenicità (febbre tifoide, colera, influenza, pertosse, epatite A). Negli anni '20 del secolo scorso le tossine del *Corynebacterium diphtheriae* e del *Clostridium tetani* sono state inattivate dalla formalina (anatossine) e hanno mantenenuto la loro capacità antigenica. Più tardi il vaccino contro l'influenza è stato preparato in subunità e il vaccino contro la pertosse è oggi costituito da singoli antigeni (vaccino acellulare).

La terza strategia riguarda la possibilità di ottenere l'antigene mediante la **tecnica DNA ricombinante** come è stato fatto una trentina di anni fa per l'antigene di superficie del virus dell'epatite B e il vaccino contro i papillomavirus (HPV) (Sykes K, 2008).

Una volta ottenuto il vaccino, è possibile usarlo come tale (**vaccino intero**) ovvero isolare gli **antigeni specifici** (**subunità**), metodica oggi molto diffusa, che permette di ottenere la separazione dell'antigene immunizzante, per ridurre al minimo la presenza nel vaccino di componenti non essenziali nei riguardi dell'efficacia (Gomes Moriel D et al, 2008).

Nella *tabella 1.1* sono riportati i tipi di preparazione dei diversi vaccini.

Materiale protetto da copyright

Tabella 1.1 Vaccini utilizzati per la vaccinazione degli umani

Vaccino	Tipo
Carbonchio	Subunità
Difterite	Subunità
Encefalite giapponese	Inattivato
Epatite A	Inattivato
Epatite B	Subunità
Febbre gialla	Vivo attenuato
Febbre tifoide	Vivo attenuato, subunità
Haemophilus influenzae tipo b	Subunità
Herpes zoster	Vivo attenuato
Influenza	Subunità, vivo attenuato
Meningococco	Subunità
Morbillo	Vivo attenuato
Papillomavirus	Subunità
Parotite	Vivo attenuato
Pertosse	Subunità

Materiale protetto da copyright

Peste	Inattivato
Pneumococco	Subunità
Poliomielite	Inattivato
Rabbia	Inattivato
Rosolia	Vivo attenuato
Rotavirus	Vivo attenuato
Tetano	Subunità
Tubercolosi	Vivo attenuato
Vaiolo	Vivo attenuato
Varicella	Vivo attenuato

Gomes Moriel D et al, 2008

L'isolamento dei polisaccaridi dalla capsula dell'*Haemophilus influenzae* tipo b, dello pneumococco, del meningococco, del bacillo della febbre tifoide e dello streptococco emolitico gruppo B, si è dimostrato utile per l'immunizzazione dei bambini al di sopra dei 5 anni e degli adulti. Più recentemente, la coniugazione dei polisaccaridi della capsula con proteine di trasporto ha messo a disposizione della popolazione vaccini capaci di attivare i linfociti T e le cellule della memoria anche in

Materiale protetto da copyright

bambini nei primi 5 anni di vita (*figura 1.2*).

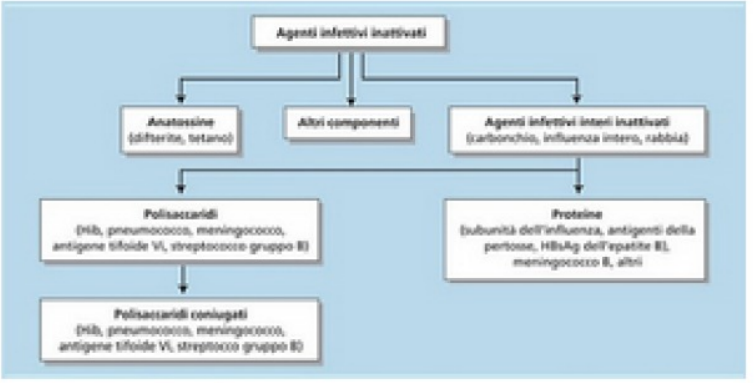

Agenti infettivi inattivati
Anatossine
(difterite, tetano)
Altri componenti
Agenti infettivi interi inattivati
(carbonchio, influenza intero, rabbia)
Polisaccaridi
(Hib, pneumococco, meningococco, antigene tifoide Vi, streptococco gruppo B)
Proteine
(subunità dell'influenza, antigeni della pertosse, HBsAg dell'epatite B), meningococco B, altri
Polisaccaridi coniugati
(Hib, pneumococco, meningococco, antigene tifoide Vi, streptococco gruppo B)

Figura 1.2 Componenti dei vaccini inattivati (uccisi)

Reverse vaccinology

Un'altra recente, innovativa modalità per la preparazione di un vaccino è quella dovuta a Rino Rappuoli e Maria Grazia Pizza (Novartis, Siena), basata sullo studio del genoma batterico per individuare le proteine in grado di conferire il massimo livello di protezione immunologica contro l'agente infettivo: questa metodica è stata chiamata ***reverse vaccinology*** (Rappuoli R, 2000; Adu-Bobie J et al, 2003; Gomes Moriel D et al, 2008; Serruto D et al, 2009). Delle 600 proteine identificate dal meningococco B (il primo batterio studiato con questa nuova tecnica) ne sono state isolate prima 20 e infine 5, che

Materiale protetto da copyright

verranno a costituire il nuovo vaccino contro il meningococco B, che entrerà in commercio nel 2012.

La possibilità di determinare l'intera sequenza genomica di un batterio con poco costo e in breve tempo (qualche mese) ha permesso infatti di conoscere le sequenze della maggior parte dei patogeni batterici. Oggi i database contengono la sequenza genomica completa di più di 100 batteri, compresi tutti i principali patogeni.

La disponibilità delle complete sequenze del genoma e i recenti avanzamenti nelle tecniche di biologia molecolare hanno fatto sì che ogni singolo antigene di un patogeno possa essere studiato, per scoprire se esso è capace d'indurre una risposta immunoprotettiva (*figure 1.3*, *1.4* e *1.5*).

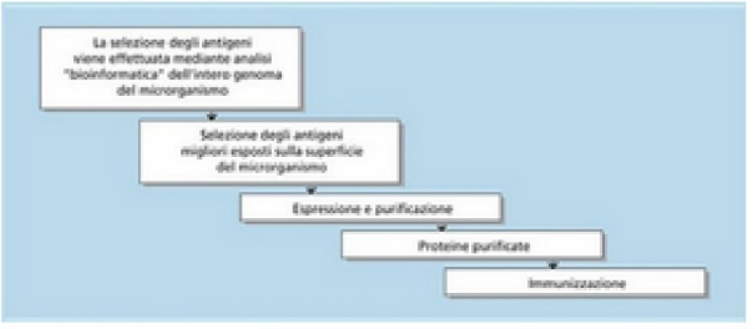

La selezione degli antigeni viene effettuata mediante analisi "bioinformatica" dell'intero genoma del microrganismo
Selezione degli antigeni migliori esposti sulla superficie del microrganismo
Espressione e purificazione
Proteine purificate
Immunizzazione

Figura 1.3 Reverse vaccinology per

Materiale protetto da copyright

l'identificazione di nuove proteine per nuovi vaccini

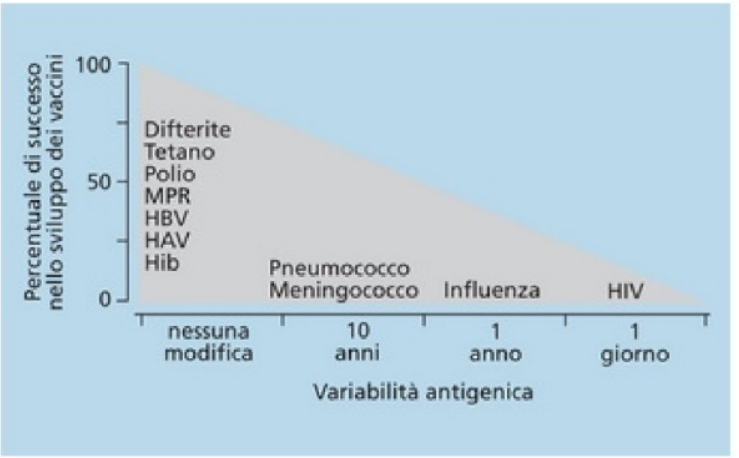


Figura 1.4 Variabilità delle caratteristiche degli antigeni dei microrganismi

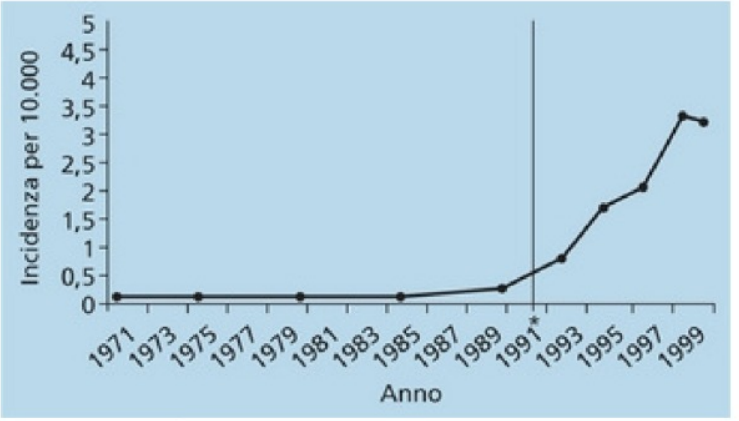


Figura 1.5 Incidenza dell'autismo in Danimarca dal 1970 al 2000 (età da 2 a 9 anni)

Materiale protetto da copyright

modificata da Madsen KM et al, 2003

Immunizzazione passiva, attiva e adottiva

L'immunizzazione viene suddivisa in:

- immunizzazione passiva
- immunizzazione attiva
- immunizzazione adottiva.

L'**immunizzazione passiva** (o sieroterapia o immunoterapia o sieroprevenzione) si basa sull'impiego di un anticorpo preformato, ottenuto dalla stessa specie (omologo) o da una specie diversa (eterologo), ma anche di tipo monoclonale (derivato cioè da un singolo clone cellulare), in un soggetto che abbia già in atto, o che sia a rischio di avere, una malattia infettiva; essa fornisce una protezione temporanea. L'anticorpo è specifico per un singolo antigene o è correlato a un gruppo di antigeni. L'impiego dell'immunizzazione passiva con siero animale (cavallo nella maggior parte dei casi) si è molto ridotto con gli anni, mentre si è diffuso sempre di più l'uso delle immunoglobuline di origine umana, in molti casi per via venosa.

Lo scopo dell'immunizzazione passiva è quello di fornire una difesa, già confezionata,

Materiale protetto da copyright

per risolvere situazioni, per lo più di tipo contingente; la difesa offerta sarà ovviamente di breve durata (2–4 mesi), perché il tempo di dimezzamento delle immunoglobuline umane è di circa 20 giorni. Dopo qualche mese il soggetto tornerà di nuovo a essere suscettibile, come lo era prima della somministrazione d'immunoglobuline, a meno che non siano state usate quantità molto elevate, nel qual caso la difesa può arrivare fino a quasi un anno dalla somministrazione: in generale il tempo necessario per la scomparsa dell'effetto protettivo delle immunoglobuline è proporzionale alla quantità somministrata. L'esempio più calzante per l'immunizzazione passiva è quello della somministrazione di immunoglobuline umane del commercio per la prevenzione delle infezioni da virus respiratorio sinciziale (750 mg/kg) o meglio di anticorpi monoclonali verso il virus respiratorio sinciziale (*Synagis*).

L'**immunizzazione attiva** si basa sull'uso di parte o di tutto un agente infettivo, al quale sia stato tolto ogni effetto patogeno e di cui sia stata mantenuta la capacità antigene, cioè la capacità d'indurre la formazione di anticorpi. Lo scopo dell'immunizzazione attiva (cioè della vaccinazione) è molto ambizioso, perché essa si prefigge l'obiettivo di conferire difese che

Materiale protetto da copyright

durino possibilmente per tutta la vita. Essa infatti mima l'infezione naturale e pertanto mette in moto tutti quei meccanismi fisiologici che riguardano, come si sa, sia il versante anticorpale, sia il versante cellulare. In effetti alcuni agenti immunizzanti danno una protezione che dura tutta la vita (*memoria immunologica*), come per esempio il vaccino contro il morbillo e la rosolia, mentre in altri casi la vaccinazione offre difese che necessitano di essere rinforzate con "richiami" a intervalli regolari (per esempio la vaccinazione antidifterica, antitetanica e antipertossica).

Lo studio della risposta anticorpale ai vaccini rappresenta un elemento essenziale per la scelta delle strategie e quindi del calendario vaccinale. La risposta immunologica ai vaccini, insieme alle conoscenze epidemiologiche (in base alle quali si decide "perché vaccinare"), costituisce l'elemento essenziale per stabilire "come vaccinare".

Alle classiche denominazioni d'immunità passiva e attiva si è aggiunto, solo molto di recente, un terzo tipo d'immunità, l'**immunità adottiva**: di essa si parla quando un soggetto, che abbia ricevuto un trapianto di midollo osseo, acquisisca immunità, e quindi presenti gli anticorpi specifici, già presenti nel donatore. Positività per anticorpi contro l'HBsAg sono di

Materiale protetto da copyright

frequente riscontro in soggetti trapiantati che erano negativi prima del trapianto.

Vengono riportati in letteratura alcuni casi nei quali l'HBsAg positività del ricevente scompare dopo il trapianto di midollo da un soggetto immune per l'HBV: con il trapianto di midollo osseo si ripristina, cioè, la capacità di rispondere all'HBV, attraverso l'acquisizione dell'immunità adottiva (Brugger SA et al, 1997; Lau GK et al, 1997; Uston C et al, 1997).

In ciascuno dei tre tipi d'immunità hanno enorme importanza gli anticorpi specifici circolanti (immunità umorale): nell'immunità attiva e in quella adottiva hanno grande importanza anche i linfociti T (immunità cellulare) che sono, con diverso ruolo, adibiti alla difesa.

Tipi di vaccino

L'immunizzazione attiva si basa sulla somministrazione di un agente infettivo intero o di parte di esso, modificato in modo tale da renderlo sicuro e poco reattogeno, come per esempio le anatossine o antigeni, purificati o prodotti con la tecnica DNA ricombinante. In tal modo si evoca una risposta immunologica analoga a quella che si verifica dopo il superamento dell'infezione naturale, senza che il

Materiale protetto da copyright

soggetto corra alcun rischio o corra un rischio molto ridotto.

L'efficacia di un vaccino si valuta in base all'entità della protezione che esso è capace di determinare nella popolazione. La determinazione della presenza di anticorpi è una misura indiretta della protezione conferita dal vaccino, ma non sempre il livello anticorpale si correla con la protezione, per cui può accadere che un soggetto sia ugualmente protetto anche senza dimostrare anticorpi in circolo (vaccinazione contro l'epatite B), come può capitare che vi sia un certo livello di anticorpi, senza che la difesa sia completamente assicurata (vaccino contro la pertosse).

I vaccini, riguardo alla loro natura, possono essere suddivisi in vaccini costituiti da agenti infettivi interi e in vaccini costituiti da componenti del microrganismo.

Vaccini costituiti da agenti infettivi interi

I vaccini costituiti dall'agente infettivo intero si possono suddividere in due grandi gruppi:

- quelli costituiti da virus o batteri vivi attenuati e
- quelli costituiti da virus o batteri inattivati,

Materiale protetto da copyright

cioè uccisi.

La maggior parte dei vaccini diretti contro le malattie virali sono costituiti da **virus vivi attenuati**, come il vaccino contro il morbillo - la parotite - la rosolia (MPR), la poliomielite (tipo Sabin (OPV), per via orale), la febbre gialla e la varicella. Per i **batteri** e **micobatteri** esempi analoghi sono rappresentati dal vaccino vivo attenuato per la febbre tifoide, costituito da una variante auxotrofica della *Salmonella typhi* (Ty21a) e dal classico vaccino di Calmette-Guérin (BCG). Nella maggior parte dei casi con questi vaccini è sufficiente una sola somministrazione, mentre in altri viene usata una seconda somministrazione, come per il vaccino MPR.

Per lo sviluppo di un vaccino, costituito da virus o batteri vivi attenuati, viene spesso usata, come abbiamo visto, una variante geneticamente attenuata, isolata da un paziente con malattia lieve; altre volte l'attenuazione viene indotta in laboratorio, attraverso passaggi su particolari terreni o in presenza di condizioni ambientali (basse temperature), in grado di attenuare o annullare la virulenza dell'agente patogeno, lasciando integra la sua capacità d'indurre una risposta immunitaria. Qualunque sia la modalità attraverso la quale è stata ottenuta l'attenuazione,

Materiale protetto da copyright

bisogna sempre ricordare che un virus o un batterio attenuato è sempre un organismo vivente, capace di diffondere e di moltiplicarsi: esso, come ogni altro essere vivente, può essere soggetto a cambiamenti e quindi alla possibilità teorica di riacquistare una certo grado di virulenza. Di qui la necessità di controllare sempre l'attenuazione del ceppo vaccinico e di scegliere quelli nei quali l'attenuazione sia apparentemente irreversibile. D'altra parte, anche un agente infettivo attenuato può risultare patogeno quando venga somministrato a un paziente immunologicamente compromesso (*vedicapitolo 4*).

I vaccini vivi attenuati debbono moltiplicarsi attivamente per indurre l'immunità: essi tuttavia danno sempre sintomi lievi, dopo un periodo d'incubazione che va da 7 a 21 giorni. I vaccini vivi attenuati possono essere influenzati negativamente dalla presenza di anticorpi circolanti, diretti verso l'antigene. Come vedremo, va tenuto conto di un sufficiente intervallo di tempo fra la somministrazione di sangue o di prodotti derivati del sangue (contenenti immunoglobuline), prima della somministrazione di vaccini vivi attenuati, del vaccino del morbillo in particolare (*vedicapitolo 4*). Poiché i virus contenuti nei vaccini vivi attenuati inducono la formazione di

Materiale protetto da copyright

interferone, è necessario che, quando si debbano somministrare due vaccini costituiti da virus vivi attenuati, o si somministrino insieme o necessitino di un intervallo di tempo di 28 giorni: questo intervallo è necessario anche quando si somministrino dosi successive di uno stesso vaccino.

Altri vaccini vengono preparati partendo da **agenti uccisi**, **cioè inattivati**, come avviene per la maggior parte dei batteri e per alcuni virus. Appartengono a questo gruppo il vaccino intero contro la pertosse, il vecchio vaccino contro il tifo e il vaccino contro il colera, per i batteri; il vaccino intero contro l'influenza, il vaccino contro l'epatite A e il vaccino inattivato contro la poliomielite (tipo Salk), per i virus. Nonostante la loro ovvia incapacità a moltiplicarsi nel ricevente, questi vaccini stimolano ugualmente il sistema immunitario e necessitano di altre somministrazioni per ottenere il massimo grado d'immunità.

Vaccini costituiti da componenti del microrganismo

Appartengono a questo tipo di vaccini quelle preparazioni che sono costituite da componenti naturali del microrganismo o da sostanze da esso stesso sintetizzate (tossine), e quelle

Materiale protetto da copyright

preparazioni che sono costituite da proteine ottenute sinteticamente con tecnica DNA ricombinante.

Vaccini ottenuti da componenti naturali

Si tratta di vaccini preparati a partire da antigeni (antigeni di superficie, tossine, polisaccaridi della capsula), sintetizzati dal batterio, che sono implicati direttamente nella patogenesi della malattia. Un esempio storico è rappresentato dai vaccini contro la difterite e il tetano che sono ottenuti, trattando le tossine della difterite e del tetano con formolo, in modo da neutralizzare completamente il loro potere tossico, mantenendo perfettamente integra la loro capacità immunizzante (*anatossine* per noi italiani e *tossoidi* per gli anglosassoni). Altri esempi sono rappresentati dai vaccini contro l'*Haemophilus influenzae* tipo b, lo pneumococco e il meningococco, che sono costituiti dai rispettivi polisaccaridi della capsula. Anche il vecchio e superato vaccino contro l'epatite B, quello derivato dal siero di soggetti portatori di HBV, era costituito dall'antigene di superficie (HBsAg) del virus dell'epatite B (HBV). Il vaccino acellulare contro la pertosse è ottenuto isolando particolari antigeni (emoagglutinina filamentosa, tossina della pertosse, pertactina e due agglutinogeni delle fimbrie) dai terreni di

Materiale protetto da copyright

coltura della *Bordetella pertussis*.

Per la detossificazione degli antigeni (tossine e sostanze di altro tipo) viene usato ancora il formolo, impiegato per la prima volta, quasi un secolo fa, da Ramon. Oggi sappiamo che questa sostanza non è solo dotata di capacità detossificante ma, in concentrazione molto più bassa e per un minor tempo, anche di un'azione stabilizzante l'antigene (Rappuoli R, 1994).

Vaccini costituiti da proteine ottenute sinteticamente

Vi sono molte ragioni che spingono i ricercatori alla preparazione di vaccini sintetici, che contengono solo proteine (antigeni): questi antigeni sintetici stimolano le difese immunitarie, umorali e cellulari, per offrire adeguate difese all'organismo, possibilmente per la vita.

Gli antigeni sintetici sono ottenuti essenzialmente secondo due vie: la via chimica e la via genetica.

Un **vaccino ottenuto chimicamente** è costituito da antigeni, ottenuti in parte o completamente per sintesi: le difficoltà incontrate nella preparazione sono legate al fatto che è riuscito finora impossibile realizzare una struttura spazialmente simile a quella esistente in natura, soprattutto da un punto di vista

Materiale protetto da copyright

tridimensionale.

Sono ormai conclusi invece gli studi per ottenere **vaccini per via genetica**, con la tecnica DNA ricombinante.

Gli enormi passi compiuti dalle conoscenze nel campo della genetica molecolare hanno permesso di disporre di geni capaci d'indurre la sintesi di sostanze biologicamente attive, corrispondenti, nei minimi dettagli, ai prodotti analoghi presenti in natura.

Questi geni sono stati trasferiti in plasmidi e successivamente in microrganismi, allo scopo finale di ottenere le sostanze (antigeni) che in essi erano codificate. È stata seguita per i vaccini la stessa strada che era stata battuta con successo per l'insulina, per l'ormone della crescita e per molte altre sostanze farmacologicamente attive.

Un punto chiave è l'inserzione del gene sul vettore (**plasmide**), che avviene grazie all'opera di enzimi altamente specifici, quali le **ligasi**, che inseriscono il gene nel vettore. Questa via, come l'inserimento del gene *S* dell'HBV nel *Saccharomyces cerevisiae*, è stata, una ventina di anni fa, coronata da successo con la sintesi dell'HBsAg, che ha permesso di ottenere quantità, praticamente infinite, di antigene, in modo da poter estendere la vaccinazione dalle classi a rischio, come veniva fatto nel passato, alla popolazione generale, come sta avvenendo nel

Materiale protetto da copyright

nostro e in molti altri Paesi. Quando, circa 20 anni fa, il vaccino veniva preparato dal siero di soggetti portatori di HBV, le attuali dimensioni di applicazione erano assolutamente impensabili.

Con il prodotto sintetico vengono eliminati molti effetti collaterali che erano dovuti a sostanze, di origine batterica o virale, che non avevano niente a che fare con l'antigene immunizzante.

Il successo, ottenuto da Rino Rappuoli e dai suoi collaboratori nel detossificare la tossina della pertosse, è stato raggiunto attraverso tecniche d'ingegneria genetica: la sostituzione di due aminoacidi (lisina in posizione 9 al posto dell'arginina e glicina in posizione 129 al posto dell'acido glutamico) ha permesso di ottenere una quasi completa detossificazione della tossina della pertosse, senza incidere sulle sue capacità immunizzanti (Pizza MG et al, 1989; Nencioni L et al, 1990; Rappuoli R et al, 1992).

Nella *tabella 1.2* sono riportate le diverse modalità di preparazione dei vaccini attualmente in commercio, e di quelli che si prevedono per il futuro (Katz S, 1997; Ellis W, 1999).

Tabella 1.2 Le 8 classi dei vaccini

Tipo di	Esempi di vaccini

Materiale protetto da copyright

vaccino	
Vaccini vivi attenuati	Vaccini contro il morbillo - la parotite - la rosolia Vaccino contro la varicella Vaccino contro la poliomielite, tipo Sabin Vaccino contro la febbre gialla Vaccino contro il vaiolo Vaccino contro i rotavirus Vaccino contro l'influenza per spray nasale Vaccino Ty21a contro la febbre tifoidea BCG
Vaccini interi uccisi	Vaccino intero contro l'influenza Vaccino potenziato contro la poliomielite, tipo Salk Vaccino contro l'epatite A Vaccino contro la rabbia Vaccino intero contro la pertosse Vaccino contro l'encefalite da morso di zecca Vaccino intero contro il carbonchio Vaccino contro il colera
Vaccini, costituiti da	Vaccino costituito da polisaccaridi non coniugati contro l'*Haemophilus*

Materiale protetto da copyright

componenti purificati	*influenzae* tipo b, il meningococco, lo pneumococco e lo streptococco emolitico gruppo B Vaccini a subunità o split contro l'influenza Vaccino acellulare contro la pertosse Vaccino contro la difterite Vaccino contro il tetano Vaccino contro la malattia di Lyme Vaccino contro la malaria
Vaccini coniugati	Vaccino costituito da polisaccaridi coniugati contro l'*Haemophilus influenzae* tipo b, il meningococco e lo pneumococco
Vaccini DNA ricombinanti	Vaccino (HBsAg) contro il virus dell'epatite B Vaccino contro i papillomavirus Vaccino (subunità B ricombinante della tossina) contro il colera
DNA vaccini	Salvo alcuni vaccini contro l'HIV, questa tecnologia non è stata ancora applicata nell'uomo
Vaccini edibili	La rivoluzione verde (patate, banane e altro)

Materiale protetto da copyright

Reverse vaccinology	Meningococco B

Concludendo, oggi le vie per ottenere, mediante l'uso dei vaccini, l'immunizzazione di un soggetto contro le malattie infettive, sono fondamentalmente otto: cinque di queste sono ormai ben conosciute, la sesta, i DNA vaccini, non è ancora entrata nell'uso, ma indubbiamente è quella maggiormente piena di promesse, e già si prospetta la settima via, quella dei vaccini edibili con i loro enormi vantaggi. Grazie alla *reverse vaccinology* avremo a disposizione nel 2012 il vaccino contro il meningococco B (*vedi tabella 1.2*).

Costituenti del vaccino

I vaccini sono formati da diversi costituenti, la cui precisa conoscenza è essenziale per il pediatra che si accinga a vaccinare.

Grossolanamente possiamo suddividere i costituenti del vaccino in due grandi gruppi: i **componenti del virus o del batterio**, costituiti dall'intero microrganismo o dall'antigene o dagli antigeni immunizzanti, e i **principi inerti**, che sono rappresentati dal liquido di sospensione, dai detossificanti, dai conservanti (compresi gli

Materiale protetto da copyright

antibiotici), dagli stabilizzanti e dagli adiuvanti (*vedicapitolo 2*).

Antigene/i immunizzante/i

In alcuni vaccini l'antigene è costituito da **una sola molecola**, come nel vaccino contro l'epatite B (HBsAg) e contro i papillomavirus (HPV), o da due, come nel vaccino contro la difterite e il tetano (anatossina difterica e tetanica) o da tre, quattro, cinque, sei o più antigeni, come nei vaccini acellulari contro la pertosse (tossina della pertosse, emoagglutinina filamentosa, pertactina e due agglutinogeni delle fimbrie) e nei vaccini combinati.

A seconda dell'agente infettivo, la **variabilità degli antigeni** è diversa: da alcuni microrganismi nei quali non esiste alcun cambiamento per decenni (difterite, tetano, polio, MPR, HBV, HAV, Hib), ad altri nei quali, come l'influenza, la variabilità antigenica avviene ogni anno, per raggiungere il massimo per l'HIV, nel quale la variabilità antigenica può essere anche quotidiana (*vedifigura 1.4*).

Altre volte ancora il vaccino è costituito da **microrganismi interi**, come i vaccini con virus vivi attenuati (vaccino contro morbillo-parotite-rosolia (MPR), vaccino contro la febbre gialla), i vaccini con batteri o micobatteri vivi attenuati

Materiale protetto da copyright

(vaccino Ty21a contro la febbre tifoide, BCG contro la tubercolosi) e i vaccini costituiti da agenti infettivi interi inattivati (vaccino intero contro la pertosse, vaccino intero contro l'influenza; vaccino inattivato contro la poliomielite). È evidente che con il progredire delle conoscenze avremo sempre più spesso a disposizione vaccini formati da antigeni immunizzanti e sempre di meno vaccini con agenti infettivi interi vivi o inattivati.

I vaccini costituiti da un peptide offrono molti vantaggi sui vaccini convenzionali costituiti da proteine intere, sia come grado di purezza, sia come elevata specificità nell'indurre risposte immuni, sia come costanza di preparazione, sia infine come costo di produzione. Tuttavia, i peptidi sintetici da soli non sono spesso abbastanza immunogenici, per cui è necessario aggiungere un potente adiuvante per il loro uso.

Negli ultimi anni i **vaccini lipopeptidici** hanno ottenuto considerevole interesse e rappresentano promettenti candidati per le vecchie e le nuove vaccinazioni. Gli studi più avanzati riguardano vaccini contro l'HIV, l'HBV, l'HCV, la malaria da *Plasmodium falciparum*, il citomegalovirus (CMV) e il virus dell'herpes simplex.

Liquido di sospensione e componenti

Materiale protetto da copyright

del terreno di coltura

Il liquido di sospensione nella maggior parte dei casi è rappresentato da acqua distillata sterile o da soluzione fisiologica sterile.

Tuttavia per alcuni vaccini può accadere che la fiala contenga proteine o altri componenti del terreno, nel quale l'agente infettivo si è moltiplicato. Al fine di evitare al massimo la presenza di queste impurità sono stati proposti numerosi protocolli e controlli di qualità (Currier JR et al, 2008).

Questa evenienza è stata sollevata, qualche anno fa, per il sospetto che, dopo l'uso di terreni di origine bovina, possano essere presenti nella soluzione del vaccino prioni originati dall'uso di tessuti animali, affetti da encefalopatia spongiforme bovina (ESB). Per evitare una tale possibilità la Food and Drug Administration (FDA) ha richiesto, alle aziende che preparano vaccini, di usare **materiali di origine bovina** ottenuti da Paesi nei quali non si siano manifestati casi di ESB. Tutte le aziende che usano terreni preparati in Paesi dove erano presenti casi di ESB furono quindi invitate, entro la fine del 2001, a sostituirli con altri, preparati in Paesi senza ESB (CDC, 2000).

Il 5 aprile 2001 il Ministero della Sanità ha inviato una raccomandazione in proposito a tutti

Materiale protetto da copyright

gli Assessorati alla Sanità delle Regioni e Province autonome.

Ricordo che il nostro Paese nel 1997 fu l'unico, in tutto il mondo, a far ritirare dal commercio due vaccini contro l'Hib che utilizzavano, come terreno di coltura, un brodo preparato da cervello, cuore e muscolo di bovino: ciò a dimostrazione dell'attenzione che le nostre Autorità sanitarie e la Commissione Unica del Farmaco rivolgevano a questo argomento (Bartolozzi G, 1997).

Detossificanti, conservanti, stabilizzanti e antibiotici

Quantità infinitesime di detossificanti (formaldeide), conservanti (mercuriali), stabilizzanti (gelatina, albumina, sorbitolo, lattosio) o antibiotici (kanamicina, streptomicina, neomicina) possono essere presenti nei vaccini: esse possono essere residui di procedure attuate durante la preparazione del vaccino, o essere state aggiunte per prevenire la crescita batterica o per stabilizzare l'antigene. In casi eccezionali si possono sviluppare reazioni da ipersensibilità verso questi componenti in soggetti sensibilizzati.

Di nessuno è stato discusso così a lungo come del timerosal.

Materiale protetto da copyright

Timerosal (o tiomersal)

L'etilmercurio-tiosalicilato di sodio viene indicato anche con altri nomi, come Thimerosal, Thiomersal (*Merthiolato* è il nome commerciale): esso viene usato da molti anni come disinfettante cutaneo, come antibatterico nelle soluzioni delle lenti a contatto e nelle gocce oculari e, infine nei vaccini, come conservante.

I vaccini sono prodotti biologici, per la cui conservazione sono necessari additivi che ne assicurino la sicurezza. Fra gli additivi il timerosal, che contiene il 49,6% di mercurio, viene aggiunto come conservante.

Il mercurio si trova in natura in tre forme:

- elemento metallico
- sali inorganici
- composti organici come il metilmercurio, l'etilmercurio e il fenilmercurio.

Per prima cosa bisogna distinguere il metilmercurio dall'etilmercurio.

Fino a oggi a questo proposito regnava una grande confusione: tutti gli studi erano concentrati sul metilmercurio, una sostanza che in natura si trova in grande quantità nei pesci predatori (tonno, pesce spada e altri) e che si era dimostrata fortemente tossica per il sistema

Materiale protetto da copyright

nervoso centrale, soprattutto nel periodo embrio-fetale, neonatale e del lattante. Negli USA più volte è stata richiamata l'attenzione delle donne in stato di gravidanza al fine di evitare l'ingestione frequente di pesci predatori. L'effetto tossico del metilmercurio è facilitato dalla lenta eliminazione del metallo per via renale.

Nei vaccini, fino a 10 anni fa, veniva aggiunto l'etilmercurio e non il metilmercurio, sul cui metabolismo e sul suo eventuale effetto tossico a carico del sistema nervoso si sapeva poco o niente. Finalmente nel novembre del 2002 è comparsa una pubblicazione che ha chiarito gli aspetti poco conosciuti dell'etilmercurio (Pichichero ME et al, 2002; Clarkson TW et al, 2003). Le concentrazioni di mercurio nel sangue, nelle urine e nelle feci dei bambini, che avevano ricevuto vaccini, contenenti etilmercurio, sono state studiate in 40 lattanti all'età di 6 mesi; 21 lattanti controllo avevano ricevuto vaccini senza etilmercurio. La quantità media di mercurio, somministrata ai bambini che ricevettero timerosal, fu di 45,6 µg a 2 mesi e 111,3 µg a 6 mesi. La quantità di mercurio nel sangue nei bambini di 2 mesi fu di 3,75–20,55 nmol/L (parti per miliardo) e nei bambini di 6 mesi di 7,5 nmol/L. La concentrazione di mercurio fu bassa nelle urine e alta nelle feci. Questa bassa concentrazione è legata alla ridotta emivita

Materiale protetto da copyright

dell'etilmercurio, che venne calcolata in 7 giorni, contro i 50 giorni del metilmercurio.

Si concluse che la somministrazione di vaccini contenenti timerosal non aumenta la concentrazione di mercurio nel sangue al di sopra dei valori considerati sicuri. L'etilmercurio viene eliminato rapidamente dal sangue attraverso le feci e le urine, dopo somministrazione per via parenterale. La risposta ai dubbi sollevati a suo tempo è finalmente arrivata. Nel frattempo il timerosal è stato tolto da tutti i vaccini, vecchi e nuovi.

Nessuna conseguenza anche nei confronti dello sviluppo psicomotorio (Pichichero ME et al, 2008).

La somministrazione di un vaccino, contenente etilmercurio, alla nascita e all'età di 5 giorni non determinò una significativa associazione con la prova dello sviluppo di Gesell, eseguita all'età di 6 mesi (Marques RC et al, 2007).

In qualche vaccino (influenzale soprattutto) il timerosal è contenuto in "tracce", cioè in quantità assolutamente trascurabili (inferiori di molte volte al microgrammo). Le tracce derivano dall'uso del timerosal nella preparazione del vaccino, dopodiché l'etilmercurio viene allontanato.

Il 2–3 dicembre 2004 il Comitato consultivo

Materiale protetto da copyright

mondiale per la sicurezza dei vaccini concluse che non vi sono prove per sospettare che nell'autismo sia da prendere in considerazione il timerosal (Knezevic I et al, 2004; Parker SK et al, 2004; WHO, 2005). L'esposizione al timerosal non causa alterazioni del neurosviluppo, a eccezione dei tic (Andrews N et al, 2004), e della maturazione neurologica e psicologica (Heron J et al, 2004).

L'allontanamento del timerosal dai vaccini in Danimarca, nel 1992, fu seguito paradossalmente da un aumento nell'incidenza dell'autismo (Madsen KM et al, 2003) (*vedifigura 1.5*).

Numerosi studi eseguiti nei soggetti vaccinati a distanza di 10 anni o meno dall'uso precoce dei vaccini contenenti timerosal, non hanno dimostrato modificazioni neuropsicologiche di rilievo (Thompson WW et al, 2007); in una ricerca italiana (Tozzi AE et al, 2009) con 24 prove su 3399 bambini che avevano ricevuto complessivamente con le vaccinazioni 137,5 μg di etilmercurio, solo due risultarono positive: la prova *finger-tapping* (rilievo della funzione motoria) nei soggetti di sesso femminile e la prova Boston Naming (linguaggio); ma gli autori comunicano che le differenze riscontrate sono piccole e rimane da determinare la loro rilevanza clinica.

Materiale protetto da copyright

Gelatina

L'attenzione dei ricercatori è stata rivolta anche alle reazioni allergiche lievi (orticaria) e gravi (anafilassi), in seguito alla somministrazione di vaccini, contenenti gelatina come stabilizzante (Kelso JN et al, 1993). Sono stati riportati sempre più spesso casi di pazienti che avevano presentato un quadro di anafilassi in seguito alla somministrazione del vaccino MPR (Miyazawa H et al, 1999; Patja A et al, 2001), non per l'allergia alle proteine dell'uovo, come si riteneva erroneamente, ma per la presenza di anticorpi specifici IgE verso la gelatina. In Giappone fra l'aprile 1994 e il marzo 1997 sono stati osservati 44 bambini con crisi gravi di anafilassi, comportanti pericolo di vita. Negli USA è stato osservato che 6 (27%) di 22 soggetti con storia di anafilassi dopo vaccinazione con MPR avevano anticorpi della classe IgE contro la gelatina (Pool V et al, 2002). Dieci bambini su 11, che avevano avuto reazioni sistemiche (inclusa l'anafilassi) dopo la somministrazione di MPR, presentavano anticorpi della classe IgE verso la gelatina. Anche altri vaccini DTP (Kumagai T et al, 2000), DTPa (Nakayama T et al, 1999), encefalite giapponese (Sakagushi M et al, 1997) e varicella (Singer S et al, 1999), contenenti gelatina come stabilizzante, hanno

Materiale protetto da copyright

determinato alcuni casi di reazioni sistemiche di tipo immediato, legate alla presenza di anticorpi IgE contro la gelatina (*vedicapitolo 9*).

Anche la gelatina, trattata con enzimi è in grado di determinare una reazione di tipo ritardato, sia pure di grado inferiore a quella dimostrata dalla molecola integra della gelatina (Kumagai T et al, 2000a).

È stata trovata una forte associazione fra allergia alla gelatina e HLA-DR9 nella popolazione giapponese (Kumagai T et al, 2001).

Albumina

In alcuni vaccini è contenuta una bassissima quantità di albumina umana (meno di 10 mg per fiala), usata come stabilizzante. È necessario ricordare a questo proposito che è stata promulgata una legge che prevede il parere positivo della persona che è in procinto di ricevere qualsiasi derivato del sangue: per questa legge sono sorte numerose perplessità sull'uso di questo vaccino. Tuttavia, a chiarimento di questa circostanza, il Ministero della Sanità, ha emanato una circolare (30 gennaio 1997) nella quale riporta il parere liberatorio del Consiglio Superiore di Sanità sull'uso di minime quantità di albumina.

Materiale protetto da copyright

Antibiotici

Non è rara l'aggiunta al vaccino di antibiotici per prevenire la crescita batterica: si tratta nella maggior parte dei casi di neomicina, streptomicina, polimixina B, aminoglicosidi.

I vaccini costituiti da virus vivi attenuati, come il vaccino MPR, contengono neomicina (MMRVaxpro, *Priorix*). La reazione più comune alla neomicina è una dermatite da contatto, locale del tipo ipersensibilità ritardata, cellulo-mediata: si tratta di una papula pruriginosa che compare dopo 48–96 ore dalla somministrazione del vaccino. Questo tipo di reazione non controindica la successiva somministrazione del vaccino (CDC, 1994).

Tuttavia le persone che abbiano presentato reazioni anafilattiche alla neomicina o ad altri antibiotici contenuti nei vaccini non debbono ricevere il vaccino contenente quella specifica sostanza, anche se la quantità presente è bassissima, inferiore spesso a quella usata per le prove cutanee per determinare l'ipersensibilità.

Non esiste più in commercio alcun vaccino che contenga penicillina e suoi derivati.

Vi sono numerosi vaccini che contengono aminoglicosidi, anche solo in tracce: *Agrippal S, Fluad, Fluarix, Imovax Polio, Infanrix Hexa, Inflexal V, Isiflu V, M-M-Rvaxpro, Pentavac, Polioboostrix,*

Materiale protetto da copyright

Polioinfanrix, Priorix, Tetravac, Ticovac, Twinrix, Varilrix, Varivax, Vaxigrip.

Vaccini coniugati

Alcune specie batteriche sono caratterizzate da una capsula ricca di polisaccaridi, importanti per la loro patogenicità:

- *Haemophilus influenzae* tipo b
- *Neisseria meningitidis*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Salmonella typhi*: antigene Vi
- streptococco β-emolitico gruppo B.

Questi agenti infettivi, pur così diversi fra loro, sono accomunati dalla presenza di polisaccaridi e quindi dalle problematiche connesse con la loro scarsa immunogenicità nei primi 3–5 anni di vita. Solo la scoperta della coniugazione dei polisaccaridi con una proteina di trasporto ha permesso di mettere a disposizione dei bambini della prima infanzia armi sicure ed efficaci contro questi patogeni, che rappresentano la causa, relativamente frequente, di patologie invasive, molto importanti nelle prime età della vita.

I polisaccaridi proteggono il batterio dalla

Materiale protetto da copyright

fagocitosi e rappresentano un evidente fattore di virulenza. L'ospite risponde all'infezione con la produzione di anticorpi specifici che si legano ai polisaccaridi, determinando un'attività di opsonizzazione favorente la fagocitosi, un processo mediato dal segmento Fc e dai recettori del complemento. Il *killing* si pensa avvenga con l'inserzione finale del complesso C8-C9 sulla membrana batterica.

L'importanza delle malattie dovute a questo complesso di agenti infettivi risultò presto evidente, soprattutto nei confronti delle forme invasive, potenzialmente mortali, come la sepsi (compresa la batteriemia occulta), la meningite e la polmonite batteriemica, sia nei primi anni di vita che nelle età successive. Deriva da questa particolare patologia il fatto che complessivamente questi agenti infettivi sono chiamati, dalla popolazione, "i batteri delle meningite".

Per qualche decennio, dopo l'introduzione dei trattamenti antibiotici antimicrobici, vi fu un rallentamento nello sviluppo dei vaccini. Successivamente le crescenti insufficienze del trattamento medico, dovute essenzialmente alla comparsa con una sempre maggiore frequenza di ceppi resistenti agli antibiotici, hanno convinto i ricercatori a dedicare maggiore attenzione al ruolo profilattico essenziale della vaccinazione,

Materiale protetto da copyright

divenuta oggi l'alternativa più adatta per risolvere il problema delle malattie invasive, dovute a questi agenti infettivi.

Fin dalle prime ricerche apparve chiaro che:

1). i lattanti e i bambini più piccoli (sotto i 3–5 anni) non rispondono con anticorpi tipo-specifici, né dopo la malattia né dopo la vaccinazione: l'incapacità a produrre anticorpi verso il polisaccaride capsulare di questi microrganismi è una delle principali ragioni dell'aumentata suscettibilità di questo gruppo di età verso le infezioni gravi (Bartolozzi G e Urbano P, 1996)

2). i polisaccaridi della capsula, sia usati come vaccini, sia in corso d'infezione naturale, elicitano una risposta immune tipo-specifica nei bambini, negli adolescenti e negli adulti

3). gli anticorpi tipo-specifici, quando presenti, sono in grado di conferire protezione

4). i polisaccaridi covalenti **coniugati** con una proteina di trasporto possono indurre una risposta anticorpale a titoli elevati anche in quelle classi di età, che abbiamo visto non rispondono al polisaccaride "nudo"

5). la vaccinazione con polisaccaridi coniugati riduce la percentuale dei portatori, nel naso-faringe, di batteri dello stesso tipo di quelli

Materiale protetto da copyright

presenti nel vaccino e concorre, in modo essenziale, al fenomeno della "*herd immunity*".

Il miglioramento delle conoscenze in immunologia e in ingegneria genetica hanno permesso d'identificare le risposte delle cellule B e T, il ruolo delle cellule T helper e suppressor, l'attività rispettiva delle cellule Th1 e Th2 e infine, in seno alle cellule B e T, la funzione delle cellule della memoria.

Lo sviluppo dei vaccini, coniugati e non coniugati, verso ***Haemophilus influenzae*** tipo b, ***Neisseria meningitidis***, ***Streptococcus pneumoniae***, **streptococco β-emolitico gruppo B** e ***Salmonella typhi*** (antigene Vi), viene descritto in dettaglio nelle rispettive trattazioni. In questo capitolo saranno sottolineati i caratteri che li accomunano.

I polisaccaridi

I polisaccaridi naturali, presenti nella capsula, sono costituiti da unità monomeriche, ripetute centinaia di volte, diverse in ogni specie batterica e in ogni sottotipo, nelle quali ogni monomero consiste di una combinazione di monosaccaridi, di fosfati e di piccole parti organiche proteiche. I polisaccaridi sono prodotti dal batterio durante la sua crescita e sono raccolti e concentrati nel

Materiale protetto da copyright

mezzo di coltura. Come abbiamo visto, queste unità polisaccaridiche sono immunogene solo nei bambini in età superiore ai 3–5 anni e in soggetti adulti (*tabella 1.3*).

Tabella 1.3 Caratteristiche dei vaccini polisaccaridici

Non stimolano le cellule della memoria
La risposta immunitaria a una seconda dose è uguale o inferiore a quella successiva alla prima dose (manca la risposta anamnestica)
Non inducono *herd immunity*
La risposta è solo in IgM
La risposta anticorpale è di breve durata (qualche anno)
Rispondono solo i soggetti in età superiore a 3–5 anni
La risposta di una dose successiva di un vaccino coniugato è inferiore a quella che avremmo avuto se il vaccino coniugato fosse stato usato per primo

Perché questa incapacità nei primi 4–5 anni di vita a rispondere agli stimoli polisaccaridici?

Mentre la maggior parte degli antigeni proteici induce nelle cellule B e T un'attivazione, con conseguente risposta anticorpale, associata

Materiale protetto da copyright

alla stimolazione delle cellule della memoria (risposte anticorpali timo-dipendenti), i polisaccaridi "nudi" sono di gran lunga meno immunogeni, nonostante ripetute stimolazioni antigeniche. Essi, descritti come antigeni timo-indipendenti, non stimolano le cellule T e non generano cellule della memoria, perché la maturità del sistema immunitario non è ancora completa nei primi 2–4 anni di vita: ne deriva che la capacità degli umani di produrre anticorpi contro i polisaccaridi, che inizia ai 2 anni di età, si completa solo a 4–5 anni. I vaccini preparati con gli antigeni polisaccaridici infatti non proteggono, quasi per niente, i bambini al di sotto dei 2 anni, e proteggono soltanto circa il 50% dei bambini immunizzati all'età di 3–4 anni.

Esistono da anni in commercio vaccini polisaccaridici verso *Haemophilus influenzae* tipo b (vaccino monovalente, non più in commercio), *Neisseria meningitidis* (vaccino tetravalente), *Streptococcus pneumoniae* (vaccino 23-valente).

In realtà questi antigeni possono stimolare solo dopo i 3–5 anni le cellule B, senza l'ausilio delle cellule T: i polisaccaridi, pur essendo timo-indipendenti, si legano ai recettori delle cellule B e in connessione con segnali di attivazione, forniti da una varietà di cellule, le attivano senza l'aiuto da parte delle cellule T CD4. Ma, come è stato ben osservato con i vaccini polisaccaridici

Materiale protetto da copyright

contro l'*Haemophilus influenzae* tipo b, il meningococco e lo pneumococco, non inducono la formazione dei centri germinali e sono d'altra parte incapaci d'indurre cellule B della memoria o ipermutazioni somatiche, che portino alla produzione di anticorpi ad alta affinità. Inoltre, il passaggio da anticorpi della classe IgM ad altre classi di anticorpi (IgG soprattutto) è fortemente limitato, in assenza delle citochine prodotte dalle cellule T helper (Delves PJ e Roitt IM, 2000; Delves PJ e Roitt IM, 2000a). Per questa ragione gli antigeni indipendenti dalle cellule T danno soprattutto un aumento di anticorpi della classe IgM a bassa affinità e di breve durata. Da ricordare che l'immunogenicità dei polisaccaridi timo-indipendenti non è aumentata dagli adiuvanti.

Con i polisaccaridi non coniugati le IgG e le IgA sono scarse e comunque nettamente inferiori a quelle che si ottengono con i polisaccaridi coniugati T-dipendenti. Il passaggio alla produzione di IgG da parte delle cellule B, secernenti IgM, richiede sempre l'interazione di un linfocita attivato T helper, antigene specifico. Con gli antigeni cellula T-dipendenti si ottiene una risposta immune già poco dopo la nascita, perché è già avvenuta la maturazione della risposta delle cellule B e T, perché è già presente la possibilità d'induzione della memoria

Materiale protetto da copyright

immunologica, perché si è già manifestata l'azione potenziatrice degli adiuvanti e perché le risposte in immunoglobuline sono complete, nella loro eterogenicità (Lindberg AA, 1999).

Vaccini polisaccaridici

I vaccini a polisaccaridi "nudi" hanno, come abbiamo visto, alcuni vantaggi e molti svantaggi. Il principale vantaggio è quello della relativa semplicità di produzione delle diverse preparazioni. Il principale svantaggio è la mancanza di una risposta protettiva, anche di breve durata, nei bambini dei primi anni di vita, in un periodo nel quale sarebbe fortemente necessario il loro effetto protettivo. Il secondo svantaggio è l'incapacità di questi vaccini di attivare le cellule della memoria: di qui la transitorietà della loro efficacia e l'impossibilità a rispondere, in senso anamnestico, a un nuovo incontro con il polisaccaride, sia esso legato all'infezione, sia alla somministrazione di un richiamo.

Vaccini coniugati

Applicando i principi della teoria aptene-supporto, Robbins e Schneerson al National Institutes of Health (Robbins JB e Schneerson R, 1990) e Anderson e Smith all'Università di

Materiale protetto da copyright

Rochester, svilupparono, nei primi anni '80, i prototipi dei vaccini coniugati, legando il polisaccaride in modo covalente a una proteina di supporto, costituita dall'anatossina tetanica o da un polipeptide mutante della tossina difterica. Il legame covalente (cioè la coniugazione) del polisaccaride (PRP) con un antigene proteico cellula T-dipendente ha lo scopo appunto di superare le caratteristiche T cellula-indipendenti del PRP.

Sebbene i lattanti e i bambini più piccoli di 3–5 anni non riconoscano efficientemente molecole immunogene cellule T-indipendenti, essi possono riconoscere e rispondere immunologicamente a immunogeni cellule T-dipendenti, come le proteine.

La coniugazione chimica di un polisaccaride con una proteina di trasporto converte il polisaccaride da immunogeno cellula T-indipendente ad antigene cellula T-dipendente. Di conseguenza i vaccini con polisaccaridi-proteina coniugati possono elicitare la sintesi di immunoglobuline protettive, della classe IgG, e stimolare la memoria immunitaria anche nei lattanti e nei bambini piccoli (Lockhart S, 2003).

Le proteine più spesso usate, perché maggiormente efficaci, sono:

- anatossina difterica

Materiale protetto da copyright

- anatossina tetanica
- CRM197, una variante non tossica della tossina difterica
- mescolanza del complesso proteico della membrana esterna (OMP) della *Neisseria meningitidis*
- proteina D della superficie dell'*Haemophilus influenzae* non tipizzabile.

Il vaccino contro l'*Haemophilus influenzae* tipo b è stato preparato per primo, per diverse ragioni: prima fra tutte la presenza in natura di un solo tipo, contro gli almeno 5 del meningococco e gli oltre 70 dello pneumococco (Bartolozzi G e Urbano P, 1996). Quindi è stato scelto per una maggiore facilità di preparazione. La concentrazione delle forme invasive nel primo-secondo anno di vita è stata di sicuro la seconda ragione di questa scelta. Il successo, anche commerciale, ottenuto con il vaccino coniugato contro l'Hib testimonia la giustezza della scelta: ricordo che il vaccino contro l'Hib è l'unico vaccino, dei tre sopraricordati, che è stato incluso nel vaccino, esavalente e che gode dell'effetto di trascinamento dei quattro vaccini obbligatori inclusi nell'esavalente (D, T, polio ed epatite B).

Da un punto di vista immunologico, c'è

Materiale protetto da copyright

ragione di pensare che i vaccini coniugati siano altrettanto efficaci, e probabilmente più efficaci, dei corrispondenti vaccini polisaccaridici a tutte le età. Come vedremo è caduta anche la possibilità, anni fa ritenuta corretta (Ada G e Isaac D, 2003), si usare il vaccino polisaccaridico come richiamo dopo una o più dosi di vaccino coniugato. I vantaggi dei vaccini coniugati rispetto ai vaccini polisaccaridici sono ben evidenti nei bambini, ma sono presenti pure nell'adulto: anche in queste età della vita la risposta immune è maggiore, l'immunità dura più a lungo, non c'è una diminuzione delle risposte immuni ripetendo la vaccinazione, e infine è ben evidente l'induzione della memoria immunologica.

Ci sono due parametri per valutare una buona risposta delle cellule B alla somministrazione di un vaccino coniugato: l'altezza raggiunta dagli anticorpi e la possibilità di indurre una risposta anamnestica in seguito alla somministrazione di una dose di richiamo (Blanchard Rohner G et al, 2008).

Conclusioni

Non esiste altro campo della vaccinologia nel quale un nuovo sviluppo nella preparazione di un vaccino sia stato così rapido e abbia avuto effetti così positivi come quello dei vaccini coniugati

Materiale protetto da copyright

nel prevenire infezioni gravi e mortali da parte di un discreto numero di patogeni umani.

Che questi vaccini coniugati si siano dimostrati efficaci per prevenire infezioni gravi nei bambini dei primi anni, rappresenta un miglioramento essenziale nell'attività preventiva del pediatra.

Efficacia e potenza dei vaccini

I principali effetti della vaccinazione sono:

- stimolazione delle difese specifiche e protezione del vaccinato dalla corrispondente malattia (**effetto diretto**)
- riduzione della possibilità che il vaccinato colonizzi e diffonda alle persone, con cui viene in contatto, i microrganismi patogeni verso cui era stato immunizzato (**effetto indiretto**).

Nel 1998 l'OMS ha reso nota la sua posizione generale nei confronti dei nuovi vaccini, che si suppone verranno impiegati su larga scala:

a). debbono soddisfare le norme di qualità che sono state definite nel documento d'informazione sulla qualità dei vaccini

Materiale protetto da copyright

(WHO/VSQ/GEN/96,02)

b). non debbono essere accompagnati da effetti collaterali gravi e debbono agire con efficacia nei confronti delle attuali malattie in tutte le popolazioni bersaglio

c). se sono destinati ai lattanti e ai giovani bambini, si debbono facilmente adattare ai calendari di vaccinazione e alla cronologia dei programmi nazionali di vaccinazione del bambino

d). non debbono interferire con la risposta immunitaria degli altri vaccini, somministrati contemporaneamente

e). debbono essere messi in commercio in modo tale da tener conto dei problemi tecnici, abitualmente riscontrati, come la refrigerazione e il modo di conservazione

f). debbono essere messi in commercio a prezzi che tengano conto dei diversi mercati.

A parte la sterilità, la sicurezza, la purezza e l'identità, un buon vaccino deve essere dotato anche di un'ottima **potenza**.

La parola potenza va interpretata come l'"abilità specifica o la capacità del vaccino, di corrispondere ad appropriate prove di laboratorio o a prove cliniche, adeguatamente controllate, ottenute attraverso la

Materiale protetto da copyright

somministrazione del prodotto in maniera programmata per raggiungere un determinato risultato". In linea di massima la valutazione della potenza è indicata dal **correlato di protezione** immunologica.

Cosomministrazioni

La ricerca in campo vaccinale ha portato a un numero di vaccini a disposizione sempre maggiore: l'aggiunta di nuovi vaccini al calendario ha avuto come conseguenza un aumento del numero di appuntamenti per le sedute vaccinali.

Per ovviare a questi inconvenienti sono state seguite due vie:

- la combinazione dei vaccini, cioè la presenza nella stessa fiala di vaccini diversi (**vaccini combinati**)
- la somministrazione simultanea, nella stessa seduta vaccinale, di vaccini diversi con siringhe diverse, in sedi diverse (**cosomministrazioni**).

La mescolanza nella stessa siringa di due vaccini al momento dell'uso non è stata mai considerata possibile, perché si tratta sempre di preparazioni con pH, concentrazione e antigeni

Materiale protetto da copyright

diversi. Ufficialmente è prevista solo la mescolanza del vaccino DTPa con il vaccino coniugato contro l'*Haemophilus influenzae* tipo b.

Le perplessità nell'uso simultaneo di due vaccini nella stessa seduta deriva dal timore che l'associazione possa portare a riduzione dell'immunogenicità e quindi dell'efficacia e/o a un aumento della reattogenicità.

Nella pratica corrente, per motivi di praticità e in primo luogo per ridurre il numero degli appuntamenti vaccinali, risultava molto utile impiegare nella stessa seduta di vaccinazione, preparazioni diverse (DTPa + polio per bocca + vaccino contro l'epatite B e altro). Tale metodica offre vari vantaggi per il servizio pubblico e per il pediatra vaccinatore, da un lato, e per il bambino e la famiglia, dall'altro. L'attività preventiva viene in tal modo semplificata come tempo e quindi come impegno economico; d'altra parte sia il bambino, sia la famiglia accettano di buon grado di ridurre al minimo gli appuntamenti per le vaccinazioni, anche se questo comporta più inoculazioni contemporaneamente. È stato dimostrato infatti che i bambini che non completano o ritardano il ciclo vaccinale sono proprio quelli che debbono rispondere a un numero superiore di sedute di vaccinazione.

Oggi con l'uso sempre più diffuso dei

Materiale protetto da copyright

vaccini combinati il problema delle vaccinazioni associate è stato notevolmente ridotto.

Controllo dei vaccini e problemi della produzione: vaccini orfani

Fra le tante funzioni dell'OMS è essenziale quella di sorvegliare la qualità dei vaccini. È stato stabilito che la sicurezza, l'efficacia e la purezza definiscono a sufficienza la qualità di un vaccino.

La qualità di un vaccino deve essere dichiarata dopo l'esame dei singoli lotti: deve essere costantemente accertata la presenza di appropriati livelli di purezza, potenza, sicurezza ed efficacia, attraverso sistemi indipendenti di ricerca.

Su queste basi l'OMS può oggi dichiarare che il vaccino contro l'*Haemophilus influenzae* tipo b ha nel mondo una qualità del 100%, mentre per il vaccino BCG (Calmette-Guérin) la valutazione è inferiore al 50%.

Negli ultimi anni l'accesso mondiale alle vaccinazioni, allo scopo di ottenere vaccini a prezzi più bassi, ha portato ad affrontare la **produzione di vaccini anche nei Paesi in via di sviluppo**, come il Brasile e l'India, che nel passato non partecipavano al mercato mondiale dell'immunizzazione. Le prove cliniche negli umani si sono fatte sempre più frequenti,

Materiale protetto da copyright

soprattutto nei Paesi nei quali sia presente un alto carico di malattie: ma spesso questi Paesi mancano di esperienza nella supervisione e nella regolamentazione delle prove cliniche negli umani.

In oltre 55 Paesi vengono prodotti vaccini, che nella maggior parte dei casi sono destinati al mercato locale. Molte delle ditte che li producono hanno scarse possibilità di sopravvivenza perché gli investimenti necessari sono imponenti già ora, ma lo saranno ancor più nel futuro, quando sarà necessario disporre di strutture adeguate per la ricerca, per la produzione e per il controllo, sempre più accurato, dei vaccini.

Nel frattempo sono stati messi in atto, dalle società produttrici di vaccini, tentativi per snellire le procedure di accreditamento: c'è per esempio un consenso quasi generale nell'auspicare l'eliminazione di alcune prove, prima fra tutte la prova di tossicità anormale (*Abnormal Toxicity Test*, ATT), indicata per alcuni sieri e vaccini, secondo le prescrizioni della Pharmacopoeia European (Schwaning A et al, 1997).

Questi cambiamenti vanno accompagnati dallo sviluppo di capacità regolatorie anche nei Paesi in via di sviluppo, in modo da assicurare la sicurezza, la qualità e l'efficacia dei vaccini,

Materiale protetto da copyright

introdotti in quei Paesi. Per questo uno dei principi guida della *OMS/UNICEF Global Immunization Vision and Strategy* (GIVS) per gli anni 2005–2015 è quello di "assicurare la qualità e la sicurezza dei prodotti e dei servizi". GIVS aiuta a estendere i servizi di vaccinazione ai soggetti e ai gruppi di età, non vaccinati, al di là dell'infanzia, per introdurre nuovi vaccini e tecnologie e per legare la vaccinazione all'erogazione di altri interventi a favore della salute. Il Dipartimento della Vaccinazione, dei Vaccini e dei Farmaci Biologici dell'OMS (IVB) ha come obiettivo quello di proteggere tutti i popoli a rischio di malattie prevenibili con la vaccinazione, assicurando la qualità e la sicurezza dei vaccini e delle vaccinazioni, attraverso uno specifico gruppo di esperti, che costituisce uno dei tre fondamentali componenti del Dipartimento.

Il *Global Advisory Committee on Vaccine Safety*, creato nel 1999, s'interessa della sicurezza dei vaccini e agisce in stretta collaborazione con gli esperti dei governi nazionali, con l'università e con l'industria. Esso si è interessato del timerosal, del rapporto fra vaccino dell'epatite B e sclerosi multipla, del rapporto fra MPR e autismo e della sicurezza dei vaccini influenzali stagionali e pandemici. Le principali fonti di finanziamento sono l'UNICEF, la Fondazione Bill

Materiale protetto da copyright

& Melinda Gates e fondi direttamente stanziati da alcune nazioni, fra le quali l'Italia.

La vaccinazione è, come abbiamo visto, il modo più efficace per controllare la diffusione delle malattie infettive. Al contrario di quanto avviene per i farmaci, i vaccini per lungo tempo non sono stati studiati in modo approfondito riguardo alle loro caratteristiche fisico-chimiche, alla loro immunogenicità e alla loro efficacia. Erano inizialmente eseguite solo le prove di potenza, che sono servite a lungo per assicurare popolazione e medici, addetti all'assistenza, che il vaccino a disposizione era il vaccino più potente per difendere da quella particolare malattia (Gupta RK, 1997).

Con l'approfondimento delle conoscenze sui vaccini ci si è resi conto che esistono altri due importanti elementi nello sviluppo e nel controllo dei vaccini: i processi di preparazione e i controlli di qualità del prodotto finale. Negli ultimi anni si è manifestata una concordanza internazionale sui processi di preparazione, che debbono seguire buone tecniche (*Good Manufacturing Practices*, GMP), e sui processi di validazione, prima dell'immissione in commercio di un vaccino. I regolamenti di GMP sono stati ricavati da regole analoghe a quelle formulate inizialmente per i farmaci, anche se i primi hanno un obiettivo essenzialmente preventivo e i

Materiale protetto da copyright

secondi un uso prevalentemente curativo.

Alle GMP fanno riferimento le *Good Clinical Practice* (GCP) che indicano gli standard internazionali di base ai quali debbono far riferimento tutti gli studi clinici, per garantire la tutela dei diritti e della sicurezza dei soggetti, insieme all'attendibilità dei dati relativi allo studio. Oggi esse prevedono:

- approvazione del Comitato etico
- consenso informato
- monitoraggio stretto
- costante controllo del prodotto in studio
- raccolta dei dati, numerosa e ben identificabile.

Oggi per esempio i vaccini (contro l'*Haemophilus influenzae* tipo b, la *Bordetella pertussis* e altri) sono misurati in microgrammi, e non più secondo metodi biologici, come nel passato. Questi miglioramenti della produzione si accompagnano necessariamente a costi elevati, problema non di secondaria importanza per i Paesi in via di sviluppo. Per tale ragione si rende necessario un continuo controllo sulle regole del GMP, che è necessario mantenere al massimo "leggere", senza perdere tuttavia nulla sotto l'aspetto della sicurezza (Podda A, 1997; Podda

Materiale protetto da copyright

A, 1998).

Hilleman ha enunciato dieci principi da seguire per la ricerca e lo sviluppo dei vaccini, che sono riportati nella *tabella 1.4* (Hilleman MR, 1998).

Tabella 1.4 Elementi da seguire per lo sviluppo di un vaccino

Gruppi	Obiettivi
Organizzazione	• Massa critica di scienziati di discipline appropriate • Individuazione della responsabilità e dell'autorità centrale
Strategia tecnica	• Definire gli obiettivi e assemblare i fatti • Individuare un piano strategico • Usare il buon senso • Stabilire gli obiettivi
Profilassi o terapia?	• Determinazione del potenziale terapeutico del vaccino efficace nella profilassi
Specificità	

Materiale protetto da copyright

	• Ricercare gli antigeni e gli epitopi • Stabilire l'importanza degli anticorpi • Risposta delle cellule T helper e citotossiche
Bilancio della risposta immune	• Immunità umorale e suo rapporto con l'immunità cellulo-mediata: definire questo rapporto è essenziale • Evitare l'adiuvante alluminio, perché predilige solo le risposte umorali
Citochine	• Definire il quadro, sia per l'ambito Th1 che Th2 • Stabilire l'utilità della associazione di citochine alla somministrazione del vaccino
Memoria immunologica	• Punto importante nella preparazione del vaccino: stabilire l'induzione della memoria • La memoria dipende dalla vaccinazione primaria ed eventualmente dai successivi richiami
Immunità a	

Materiale protetto da copyright

livello delle mucose	• Il modo principale per trasmettere la maggior parte dei virus è la via delle mucose • Valutare se i vaccini, che hanno successo a livello delle mucose sono in grado di prevenire le infezioni parenterali
Vettori	• Virus vivi ricombinanti • Vettori a DNA, che richiedono maggiori conoscenze
Protezione	• Prove cliniche per stabilire la sensibilità • Prove con placebo

Hilleman MR, 1998

Il tempo necessario per giungere dall'ideazione iniziale alla disponibilità del vaccino sul mercato viene stimato in circa 10 anni (*figura 1.6*).

Materiale protetto da copyright

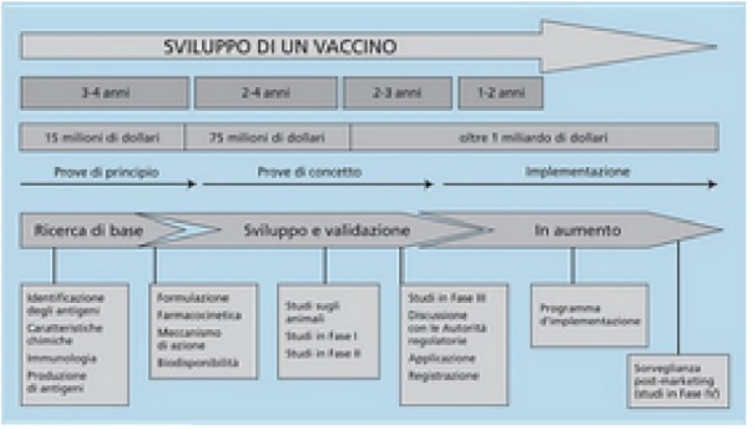


Figura 1.6 Fasi dello sviluppo di un vaccino

modificata da Barone M, 2008

Le fasi di sperimentazione clinica per lo sviluppo dei vaccini sono le stesse di quelle usate per i farmaci (*vedifigura 1.6* e *figura 1.7*) (Rao MR et al, 2002). La registrazione di un vaccino nel nostro Paese può avvenire a volte anche subito dopo la fase II, perché la fase III era già stata fatta in altri Paesi. La fase IV ha molti punti di contatto con le norme della Farmacovigilanza. Alla fine delle diverse fasi, può essere affermato che è stata raggiunta una sufficiente conoscenza delle caratteristiche di reattogenicità e d'immunogenicità di un vaccino: manca la sicurezza sulla sua efficacia, che necessita di qualche ulteriore anno.

Materiale protetto da copyright

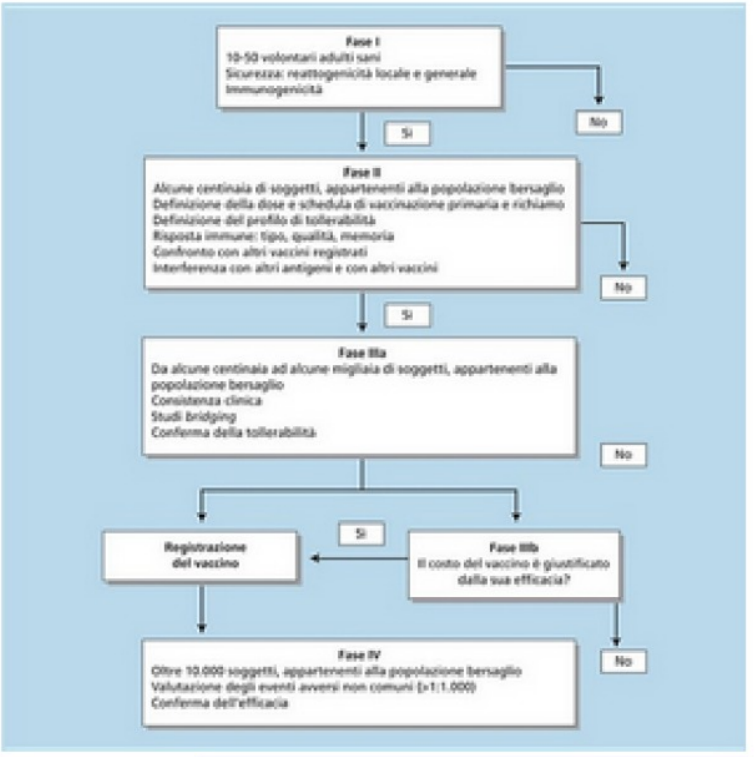


Figura 1.7 Fasi di sperimentazione clinica per lo sviluppo di un nuovo vaccino

Uno studio clinico per la sperimentazione di un vaccino deve essere accuratamente programmato, eseguito e comunicato in modo tale che vi sia sempre pubblica garanzia sull'attendibilità dei dati e sulla protezione dei diritti e quindi dell'integrità dei soggetti coinvolti.

I principi del **consenso informato** furono

Materiale protetto da copyright

stabiliti dal Codice di Norimberga, poi sviluppato dall'Associazione Medica Mondiale nella prima dichiarazione di Helsinki (giugno 1964). La protezione dei soggetti coinvolti nella sperimentazione è di fatto assicurata dai Comitati etici e dallo stesso Consenso informato.

Purtroppo il nostro Paese, anche nell'approvazione e quindi nell'entrata in commercio di un vaccino, brilla per la sua estrema lentezza: quasi sempre è necessario oltre un anno fra l'inoltro della domanda e l'approvazione da parte del Ministero della Salute, contro i 30–40 giorni necessari negli altri Paesi civili.

Un argomento che negli ultimi anni è stato più volte affrontato è quello dei **vaccini orfani**; la preparazione infatti di vaccini verso malattie infettive rare, ma emergenti, è ostacolato da molte condizioni, la più importante delle quali è rappresentata dal fatto che la maggior parte delle aziende che preparano vaccini incentivano ovviamente le ricerche su quei vaccini dalla cui vendita potranno ricavare dei profitti (Lang J e Wood SC, 1999).

A questo proposito la US Orphan Drug Act nel 1983 e una successiva simile proposta della Commissione europea hanno suggerito di fornire incentivi finanziari e pratici per la ricerca e lo sviluppo di farmaci (compresi i vaccini)

Materiale protetto da copyright

necessari alle aziende farmaceutiche per interessarsi delle malattie rare.

Aspetti metodologici per l'esecuzione degli studi sui vaccini: i modelli matematici

Negli ultimi anni si è manifestato un riesame delle diverse prove in campo sia medico sia farmaceutico, basate sulla codificazione delle "buone pratiche di laboratorio", delle "buone pratiche di preparazione" e delle "buone pratiche di ricerche cliniche". Questi cambiamenti costituiscono la base della *Evidence Based Vaccinology* (EBV), un prototipo della medicina basata sull'evidenza (EBM). In altre parole l'EBV è l'identificazione e l'uso delle prove migliori, sia durante lo sviluppo dei vaccini, sia dopo la loro entrata in commercio (Nalin DR, 2002).

I vaccini, a differenza degli altri farmaci, sono in continuo sviluppo sia prima sia dopo l'entrata in commercio. I cambiamenti nelle tecnologie biologiche di preparazione e i cambiamenti che i vaccini inducono nella popolazione e nella biologia della malattia portano alla necessità di revisioni periodiche delle pratiche vaccinologiche (e qualche volta del dosaggio), basate sui dati immunologici sempre

Materiale protetto da copyright

nuovi e sulla percezione della sicurezza e della efficacia del vaccino.

Anche in tema di vaccinazioni gli studi clinici controllati, cioè la stima dell'efficacia di un vaccino quando usato in una popolazione, rappresentano gli elementi essenziali per prendere decisioni operative. Essi infatti sono il metodo empirico più obiettivo e riproducibile tra quelli a nostra disposizione accanto alle ricerche sull'immunogenicità, sulla reattogenicità e sull'epidemiologia.

Purtroppo le metodologie che vengono seguite per il rilievo dei risultati di una campagna di vaccinazione sono molto diverse, per cui a volte rimane molto difficile confrontare tra loro i risultati ottenuti dai vari studi.

È venuto quindi il momento di rendere omogenei i **metodi di rilevazione di efficacia** e i diversi aspetti che devono essere presi in considerazione: dalla definizione di caso clinico all'esatta valutazione dei casi, mediante indagini sierologiche e batteriologiche dirette, utilizzando anche le più moderne tecniche d'identificazione (PCR). Solo in tal modo i risultati potranno essere sempre più oggettivi e quindi confrontabili con quanto già noto o con quanto viene utilizzato contemporaneamente.

Altrettanta cura deve essere posta nella preparazione di **metanalisi** sull'efficacia dei

Materiale protetto da copyright

vaccini, poiché nella loro preparazione la possibilità di errori è molto frequente, soprattutto nel posizionamento dei paletti in base ai quali stabilire quali pubblicazioni debbano essere prese in considerazione e quali meno (Jacobson RM, 1999; De Vito C et al, 2007). Altre cause di scarsa attendibilità delle metanalisi includono:

- ricerche bibliografiche non complete
- errori nella selezione degli studi
- mancanza di valutazione dei singoli studi
- mancanza di valutazione dell'eterogeneità negli studi
- errori d'interpretazione.

Nello studio sull'utilità dei vaccini è apparsa subito evidente la necessità di ricorrere a **modelli matematici** quando si valutino diverse strategie vaccinali. Il modello matematico "base" più spesso usato è comunemente definito come "modello SEIR", un acronimo derivato dai termini Suscettibile, Esposto, Infettivo e Rimosso.

Ovviamente la rilevanza pratica delle risposte che i modelli matematici possono dare dipende dalla qualità delle stime dei loro parametri chiave e quindi dalla qualità dei dati usati per tali stime, che in linea di massima si

Materiale protetto da copyright

riferiscono al periodo pre-vaccinale, in cui la malattia si trovava nelle sue manifestazioni naturali (Lunelli A e Pugliese A, 2010). Ne deriva che le deduzioni ricavate da modelli matematici, applicati all'uso dei vaccini, debbono essere valutate con prudenza e non considerate come verità assolute sulle quali basare raccomandazioni e strategie ritenute immutabili (Principi N, 2007).

Fonti d'informazione sui vaccini

Ugualmente viene sentita da molti ricercatori la necessità che, anche nel riportare i risultati di studi e ricerche in pubblicazioni a stampa, siano seguiti schemi prefissati, per impedire che la ricerca esposta manchi d'importanti dettagli metodologici, che ostacolino l'interpretazione dell'efficacia e dell'immunogenicità dei vaccini. Si rende necessaria anche una maggior aderenza nel titolo della pubblicazione al contenuto della ricerca, perché da un confronto fra quanto pubblicato nel corso degli ultimi anni sulla rivista "Vaccine" e una ricerca sul Medline è risultato che con quest'ultimo si perde oltre il 50% delle pubblicazioni di rilevante interesse (Jefferson T et al, 1996).

Un altro aspetto importante riguardante le

Materiale protetto da copyright

fonti d'informazione dei vaccini è la dispersione delle pubblicazioni in riviste nazionali e internazionali, più o meno specialistiche.

Alcune riviste sono dedicate esclusivamente alle pubblicazioni sui vaccini, come "Vaccine", che, in un solo anno, comprende oltre 8000 pagine in fascicoli settimanali con molti supplementi, come "Expert Review Vaccines", "Human Vaccines Journal", "Open Vaccine Journal".

Altre riviste riguardano immunologia e vaccini, come "Clinical and Vaccine Immunology", "Journal of Immune Based Therapies and Vaccines", e altre ancora sono dedicate alle malattie infettive, ma comprendono un gran numero di pubblicazioni sui vaccini (una è pediatrica e le altre sono per bambini e adulti): "Pediatric Infectious Diseases Journal", "Journal Infectious Diseases", "Clinical Infectious Diseases", "Lancet Infectious Diseases", "Open Infectious Diseases Journal".

Infine numerose pubblicazioni sui vaccini si trovano anche nelle riviste di microbiologia, come "Clinical Microbiology and Infection, Journal Clinical Virology".

Ma alcuni articoli, di cui alcuni di fondamentale importanza, vengono pubblicati, sia pure di rado, anche nei più importanti giornali, sia pediatrici sia di medicina generale, sia italiani

Materiale protetto da copyright

sia esteri, come "Pediatrics", "Lancet" e "New England Journal of Medicine", JAMA e altri.

Esistono poi un numero infinito di riviste di poche pagine, edite dalle aziende farmaceutiche che preparano vaccini, sulle quali sono riportate le notizie più importanti sulle vaccinazioni e sui vaccini.

Come leggere una pubblicazione sui vaccini

Capita spesso negli studi sui vaccini che vengano ricordati alcuni indicatori epidemiologici che possono rendere difficile la comprensione da parte del comune lettore.

Di seguito sono riportate alcune delle più frequenti valutazioni sull'uso e sulla efficacia dei vaccini, la maggior parte delle quali deriva da un capitolo, con lo stesso titolo, scritto dal dottor Alberto Tozzi sul *Manuale delle Vaccinazioni* (2009).

Indicatori riguardanti l'immunogenicità

In preparazione degli studi di efficacia, grande importanza hanno assunto gli studi che s'interessano dell'immunogenicità, cioè della risposta anticorpale, indotta dalla vaccinazione.

È in base allo studio del livello anticorpale e

Materiale protetto da copyright

del suo rapporto con l'efficacia clinica che viene calcolato il **correlato di protezione,** cioè il livello anticorpale al di sopra del quale l'individuo è protetto dalla malattia. *Esiste, per ogni agente infettivo, uno specifico correlato di protezione*, cioè un livello minimo di anticorpi al quale corrisponda l'efficacia clinica; conosciamo ormai il correlato di protezione per molti agenti patogeni: va sottolineato che ogni singola malattia ha un suo correlato di protezione (*tabella 1.5*).

Tabella 1.5 Correlati di protezione per diverse malattie

Vaccini	Anticorpi	Correlato di protezione
Tetano	Antitossina tetanica	≥0,1 UI/mL
Difterite	Antitossina difterica	≥0,1 UI/mL
Pertosse intero	Agglutinine	≥1:32
Pertosse acellulare	Sconosciuto	
Poliomielite	Anticorpi	≥1:8 UI
Encefalite giapponese	Anticorpi neutralizzanti	≥1:16
Morbillo	Anticorpi	≥1:8
Parotite	Anticorpi	≥1:8
Rosolia	Anticorpi	≥1:8
Epatite B	Anticorpi anti-HBs	≥10 mUI/mL
Epatite A	Anticorpi	≥1:30 mUI/mL
Varicella	Anticorpi	≥1:10 (EIAMA)
Influenza	Anticorpi inibenti l'emo-agglutinazione	1:40
Haemophilus influenzae tipo b	Anticorpi PRP	≥1 µg/mL
Meningococco coniugato	Anticorpi PRP	Sconosciuto
Pneumococco coniugato	Anticorpi PRP	0,35 µg/mL (ELISA)
Papillomavirus	Sconosciuto	
Rotavirus	Sconosciuto	

Ovviamente la mancanza del correlato di protezione per alcune patologie e per alcuni

Materiale protetto da copyright

vaccini non significa affatto che il superamento della malattia o l'esecuzione della vaccinazione non siano in grado di conferire un'immunità efficace, che perduri nel tempo, ma significa solo che, al momento, sono sorte delle difficoltà per la definizione del correlato di protezione, per ragioni le più diverse (difficoltà nello stabilire il momento dell'infezione, relativa novità del vaccino o dell'identificazione della malattia, altro).

Nel caso che un agente infettivo determini più quadri clinici, avremo necessariamente diversi correlati di protezione, ciascuno di essi per una determinata localizzazione dell'infezione: per esempio per lo pneumococco abbiamo un correlato per le malattie invasive (ematogene), un correlato per l'otite e uno per la colonizzazione naso-faringea, mentre non abbiamo ancora un correlato di protezione per la polmonite. È chiaro invece che, quando un agente patogeno determini un solo quadro clinico (tetano per esempio) o quadri clinici fra loro similari (difterite), avremo un solo correlato di protezione. È importante sottolineare a questo proposito che il correlato di protezione, ricavato da studi sulle malattie invasive, non predice la protezione per l'otite media o per la colonizzazione naso-faringea, per le quali è necessario che venga raggiunto un livello

Materiale protetto da copyright

anticorpale superiore e quindi un correlato di protezione da 3 a 6 o 10 volte superiore a quello riscontrato per le malattie invasive. La **disomogeneità dei correlati di protezione, a seconda della sede del processo patologico**, si correla strettamente con la diffusione degli anticorpi nei diversi tessuti, poiché nell'orecchio medio o nelle cavità del naso-faringe esistono delle barriere anatomo-funzionali, per superare le quali sarà necessario che il livello anticorpale nel sangue circolante sia proporzionalmente maggiore.

Per valutare la risposta anticorpale di un vaccino si può ricorrere all'identificazione del **numero dei risponditori, espresso in percentuale di *responder*** nei confronti del raggiungimento di una determinata soglia anticorpale: in generale le misurazioni del livello anticorpale vengono eseguite a distanza di un mese dalla fine del ciclo primario.

Insieme alla percentuale di risponditori, viene spesso determinato il **titolo medio geometrico** (*Geometric Mean Titer*, GMT) o la **concentrazione media geometrica** (*Geometric Mean Concentration*, GMC), che esprimono la media dei titoli anticorpali ottenuti dopo la vaccinazione. Trattandosi di una media dei titoli anticorpali, questi valori non permettono di stabilire quanti siano i soggetti risponditori: per

Materiale protetto da copyright

questa ragione i due parametri sopra ricordati vengono molto spesso espressi contemporaneamente.

Lo studio dei titoli anticorpali permette inoltre di stabilire informazioni sulla **durata della protezione** e sulla capacità di un vaccino d'indurre la **memoria immunologica** (*priming*), che può essere rinforzata attraverso un richiamo. Di regola più elevati sono i titoli anticorpali, riscontrati subito dopo il completamento della vaccinazione primaria e maggiore è la loro persistenza nel tempo.

In particolare, quando si voglia stabilire con precisione la durata della protezione conferita da un vaccino nel tempo, vengono misurate le percentuali di risponditori e il livello delle medie anticorpali a intervalli di tempo crescenti dalla somministrazione del vaccino, come può essere valutata la risposta di una dose di richiamo, a lunga distanza dal ciclo primario, se la protezione è durevole. La risposta immune a una dose di richiamo è caratterizzata da un innalzamento rapido e "robusto" dei titoli anticorpali, anche a livelli superiori a quelli riscontrati a breve distanza dal completamento della vaccinazione primaria (**risposta anamnestica**) (Tozzi A, 2009).

Non sempre lo studio del livello dei titoli anticorpali permette di stabilire con precisione la

Materiale protetto da copyright

durata della protezione di un determinato vaccino: può accadere che a livelli bassissimi o alla assoluta scomparsa degli anticorpi, corrisponda un'ottima risposta a una dose di richiamo del vaccino, tipica di un'altrettanto ottima memoria immunologica: questo rilievo è particolarmente vero per la vaccinazione contro l'epatite B.

Indicatori riguardanti l'efficacia clinica

Più importanti degli studi sulle risposte anticorpali, sono gli studi che valutano l'**efficacia clinica** di un vaccino, nei quali si contano i vari episodi di malattia nei vaccinati e nei non vaccinati.

Va detto tuttavia che questi studi non sono sempre eseguibili e che sono sempre molto costosi, soprattutto quando la malattia da studiare è rara.

L'efficacia clinica di un vaccino viene definita come la riduzione percentuale dell'incidenza della malattia in una popolazione vaccinata rispetto a una non vaccinata. Questo parametro viene calcolato in generale con studi sperimentali (*clinical trial*), che si basano sull'incidenza della malattia nella popolazione generale e nei vaccinati.

La formula che misura l'efficacia di un

Materiale protetto da copyright

vaccino è la seguente:

$$\frac{(\text{incidenza nei non vaccinati} - \text{incidenza nei vaccinati})}{\text{incidenza nei non vaccinati}} \times 100$$

Nel giudizio sull'efficacia di un vaccino vengono usati in letteratura (nelle pubblicazioni in lingua inglese) due termini ben distinti ***efficacy*** ed ***effectiveness***. Queste due parole hanno un ben preciso significato, pieno di risvolti pratici (Tozzi AE, 2006).

Efficacy (si può tradurre con efficacia) valuta l'efficacia di un vaccino (o di un qualsiasi altro farmaco) in condizioni controllate, come per esempio durante una ricerca clinica: in questi casi la definizione di malattia e quindi di "caso" da prevenire è specifica e precisa, spesso accompagnata da un esame di laboratorio positivo per indicare quel particolare quadro clinico.

Effectiveness (che possiamo tradurre con efficienza) invece indica l'effetto di un vaccino nella vita reale, cioè nella popolazione, nella quale la diagnosi della malattia è fatta soltanto sul rilievo clinico, come avviene di regola per le valutazioni del numero di casi d'influenza, basato solo sulla definizione clinica (*Influenza Like-Illness*, ILI). Poiché l'*effectiveness* può comprendere affezioni dovute ad agenti infettivi

Materiale protetto da copyright

diversi, capita quasi sempre che *effectiveness* viene indicata con un numero più basso di quello con il quale viene indicata *efficacy*.

Il modo migliore per condurre uno studio del genere è quello delle **prove cliniche randomizzate, in doppio cieco**, nelle quali i pazienti sono distribuiti a caso nel gruppo trattato e nel gruppo controllo: la randomizzazione è uno strumento molto potente che ha lo scopo di rendere simili i gruppi in sperimentazione, a eccezione del trattamento in studio. La randomizzazione protegge da alcune distorsioni, mentre la sua applicazione ci dice che ci troviamo di fronte a uno studio con alto grado di evidenza. In assenza di randomizzazione uno studio uguale sotto ogni altro riguardo avrà un'evidenza minore. "In doppio cieco" significa che né lo sperimentatore, né il paziente sono a conoscenza della somministrazione o meno del prodotto in studio; per questa ragione vanno ben tenute presenti le caratteristiche del vaccino e del suo placebo. Negli studi sui vaccini la cecità è utile soprattutto per valutare accuratamente il profilo di sicurezza dei vaccini. In assenza di cecità sia i pazienti sia le loro famiglie, sia i medici sperimentatori avrebbero inconsciamente una maggiore propensione a tener conto degli effetti collaterali, anche minimi, se questi si fossero

Materiale protetto da copyright

presentati nel gruppo nel quale era prevista la somministrazione del vaccino. La mancanza di questa precauzione è a volte essenziale.

Per la precisione dei risultati è necessario tener conto di tutta la popolazione, suddivisa per gruppi di età, oppure di una determinata fascia di età o di un certo territorio. Il risultato sarà tanto più preciso quanto più il numero dei soggetti studiati si avvicinerà alle dimensioni della popolazione totale.

Se la valutazione dell'efficacia viene espressa con una media, è utile calcolare l'**intervallo di confidenza 95%**: i limiti superiore e inferiore indicano l'intervallo dei valori entro il quale è compreso il 95% delle osservazioni. Più vicini sono i due numeri e maggiore è l'efficacia reale dell'intervento adottato; maggiore è la distanza fra i due numeri e maggiore è la probabilità che la stima ottenuta sia imprecisa.

Molto spesso vengono utilizzati, nel confronto fra due bracci dell'esperimento, i **test statistici**, fra i quali primeggia la ben conosciuta **P** (o "p"), che viene considerata significativa quando è inferiore a 0,05. La P indica la probabilità che un determinato risultato, basato sulla differenza fra due stime, sia dovuto al caso. Per esempio una $P \leq 0{,}05$ ci dice che una differenza osservata ha meno del 5% di

Materiale protetto da copyright

probabilità di essere dovuta al caso (cioè una probabilità su 20), ma una P di 0,001 significa che la differenza riscontrata ha una sola probabilità su 1000 di essere dovuta al caso e 999 probabilità che essa sia collegata al trattamento che noi abbiamo condotto.

Nella valutazione della P viene tenuto conto ovviamente del **numero dei pazienti** dei due gruppi.

La dimensione della popolazione studiata è importante anche per la **valutazione degli effetti collaterali** associati all'impiego di un vaccino. Studi di piccole dimensioni non sono in grado di mettere in evidenza eventi rari, mentre studi di grandi dimensioni hanno una maggiore attendibilità (oggi è frequente l'impiego di un nuovo vaccino su 60.000 soggetti, prima dell'immissione in commercio).

Merita soffermarsi sulla valutazione che il lettore dà alle stime di efficacia dei vaccini in studio. In generale le stime di efficacia vengono riportate in percentuale: un vaccino che abbia un'efficacia dell'85% significa che esso è capace di prevenire l'85% delle malattie che si sarebbero presentate nei soggetti vaccinati. Ne deriva che se una malattia è molto frequente, la probabilità di prevenirla è maggiore e quindi il numero dei casi prevenuti dalla vaccinazione nella popolazione sarà molto alto. Al contrario se

Materiale protetto da copyright

consideriamo una malattia a bassa frequenza (per esempio 20 casi/100.000 anno), il vaccino, se ha un'efficacia dell'85%, è in grado di prevenire solo 17 casi su 100.000 soggetti per anno.

Partendo da questa differenza – che viene calcolata come il **reciproco della riduzione assoluta del rischio** (*absolute risk reduction*) – è possibile ottenere un altro indice, il **numero di pazienti da trattare per prevenire un caso di malattia** (*Number Needed to Treat*, NNT).

Per valutare la riduzione assoluta del rischio si calcola la semplice differenza fra l'incidenza osservata nei non vaccinati e quella nei vaccinati, cioè il risparmio in termini d'incidenza per effetto della vaccinazione. La riduzione assoluta del rischio viene utilizzata negli studi sull'efficacia dei farmaci per calcolare il NNT. L'inverso della differenza delle incidenze dei guariti permette, infatti, di stimare quanti pazienti è necessario trattare per ottenere una guarigione (Chatellier G et al, 1996; Tozzi EA, 2006a; Tozzi EA, 2006b; Macchiaiolo M, 2008). Era usata nel passato anche una valutazione specifica per i vaccini (*Number Needed to Vaccinate, NNV*) (Kelly H et al, 2004).

Ovviamente tanto minore è il numero di soggetti da trattare, tanto maggiore sarà l'efficacia del trattamento.

Mentre per i farmaci in generale questo

Materiale protetto da copyright

indice ha un suo significato, quando la sua applicazione venga usata per i vaccini la sua applicazione necessita di un'estrema cautela, perché esso non tiene conto di altri parametri, quali la gravità della malattia, la presenza di *herd immunity* indotta dalla vaccinazione e infine dei costi associati al vaccino, ma anche alla malattia e alle sue conseguenze. Alcuni autori erroneamente hanno proposto l'uso del NNT per stimare quanti soggetti è necessario vaccinare per prevenire un caso di malattia (Tozzi A, 2009).

Per valutare l'**impatto di una vaccinazione sulla popolazione**, è essenziale tener conto anche della copertura vaccinale che viene raggiunta moltiplicando l'*effectiveness* per la copertura vaccinale. Solo con alte coperture (oltre il 90–95%) è possibile ottenere la maggiore riduzione della malattia in una popolazione.

La durata del **controllo a distanza dei pazienti** (*follow-up*) è un elemento essenziale per la valutazione dell'efficacia e della tollerabilità dei vaccini. In generale gli studi sul controllo a distanza si limitano all'osservazione per un anno dopo la vaccinazione; ma in alcuni casi (per esempio la vaccinazione contro i papillomavirus) il controllo va esteso a decenni. Sotto questo riguardo molto importante è il

Materiale protetto da copyright

numero di soggetti che non concludono lo studio, che dovrebbe essere il più piccolo possibile (non superiore al 20%).

L'applicabilità dei numerosi parametri, ricavati dalla lettura di una pubblicazione sui vaccini, alla pratica clinica corrente, richiede un'ulteriore elaborazione difficilmente quantificabile: essa si basa non solo sull'incidenza della malattia da prevenire, ma anche sulla sua gravità, sulla sua letalità, nonostante il miglior trattamento e sulla frequenza degli esiti presenti nei sopravvissuti, tanto da giustificare comunque la somministrazione del vaccino, come accade per alcuni vaccini in uso.

Analisi per protocollo e analisi *Intention to Treat*

In generale nelle recenti prove cliniche su un numero elevato di soggetti (come è avvenuto per i vaccini contro i papillomavirus) vengono eseguite due analisi dei risultati:

- per protocollo
- *Intention to Treat* (ITT).

L'**analisi per protocollo** riguarda la determinazione dell'efficacia di un vaccino in soggetti che non avevano mai incontrato alcun

Materiale protetto da copyright

agente infettivo (papillomavirus) in precedenza, che avevano eseguito le tre vaccinazioni a intervalli regolari, che si erano presentati nel tempo prescritto ai successivi controlli e che infine avevano seguito accuratamente i controlli a distanza.

L'analisi (***Intention To Treat***, ITT) riguarda quanto avviene invece nella vaccinazione della popolazione nel suo complesso: alcuni soggetti possono aver già incontrato papillomavirus, o possono esser passati da un gruppo a un altro, o possono aver saltato anche un'intera dose, e non aver rispettato gli intervalli indicati fra le dosi, o non essere stati presenti ai controlli durante lo studio o a quelli a distanza. Ovviamente un giudizio veritiero sull'efficacia del vaccino lo si ottiene solo valutando i risultati dell'analisi per protocollo, mentre l'efficacia delle analisi per ITT portano a percentuali più basse, spesso con cifre che sono solo la metà di quelle osservate dopo l'analisi per protocollo.

Tipi di studio

Negli **studi caso-controllo** viene ricostruita la storia di un determinato evento partendo dalla fine (Tozzi A, 2009). Per esempio è possibile calcolare l'efficacia di un vaccino durante un episodio epidemico studiando i casi di malattia, scegliendo un gruppo di sani e ricostruendo a

Materiale protetto da copyright

posteriori la loro storia vaccinale. Questo tipo di studio viene usato anche per studiare gli effetti collaterali associati alle vaccinazioni, soprattutto se questi sono rari: il livello di evidenza, fornito da questi studi, è intermedio, perché essi sono esposti a una serie di distorsioni, a volte molto notevoli.

Gli **studi di coorte** studiano semplicemente la storia di un'esposizione (Tozzi A, 2009). Per esempio un gruppo di vaccinati e un gruppo di non vaccinati viene seguito per un certo periodo di tempo, durante il quale vengono registrati gli episodi di malattia e gli effetti collaterali. Appartengono a questo tipo di studi, gli **studi sui contatti familiari** (*household contacts*), che garantiscono che i conviventi siano effettivamente esposti alla malattia. Il livello di evidenza assegnato a questi studi è intermedio.

I ***clinical trial*** sono gli studi sperimentali con il disegno più affidabile e dotato di maggior livello di evidenza (Tozzi A, 2009). In questo tipo di studi vengono stabilite le regole per fare in modo che i gruppi degli esposti (vaccinati e non vaccinati) siano del tutto simili, se non per l'uso del vaccino: la randomizzazione e la doppia cecità sono gli accorgimenti tipici di questo tipo di studi. Come abbiamo visto la **randomizzazione** serve proprio a permettere

Materiale protetto da copyright

che i due bracci (vaccinati e non vaccinati) siano perfettamente confrontabili: l'assegnazione casuale, e non manipolata dallo sperimentatore, distribuirà, proprio per effetto del caso, tutte le caratteristiche potenzialmente interferenti, comprese quelle sconosciute, in ugual misura nei due bracci della prova. La cecità (dello sperimentatore e del paziente) serve a prevenire che un pregiudizio del medico o del paziente possa condizionare i risultati: a volte è necessario compiere degli sforzi per evitare che il farmaco attivo sia riconoscibile dal placebo.

A volte si confrontano due vaccini per dimostrare quale dei due sia superiore per efficacia, per immunogenicità e per tollerabilità; a volte invece vengono eseguiti studi per dimostrare una *non inferiorità* o "*un'equivalenza*".

Le **revisioni sistematiche di *clinical trial*** sono studi che includono tutte le prove cliniche disponibili sull'argomento. Il primo scopo di questi studi è quello di verificare se le prove incluse siano fra loro coerenti, cioè se gli effetti riscontrati vadano tutti nella stessa direzione; il secondo scopo è quello di raggruppare gli studi simili per aumentare il numero delle osservazioni (**metanalisi**). I risultati delle revisioni sistematiche e delle metanalisi forniscono un elevatissimo livello di evidenza: questo tipo di studi viene considerato come riferimento per la

Materiale protetto da copyright

raccomandazioni, contenute nelle linee guida.

Tabella 1.6 Classificazione delle evidenze e delle raccomandazioni

Livelli di prova	
I	Prove ottenute da studi clinici controllati e randomizzati e/o da revisioni sistematiche di studi randomizzati
II	Prove ottenute da un solo studio randomizzato di disegno adeguato
III	Prove ottenute da studi di coorte non randomizzati con controlli concorrenti o storici o loro metanalisi
IV	Prove ottenute da studi retrospettivi tipo caso-controllo o loro metanalisi
V	Prove ottenute da studi di casistica (“serie di casi”) senza gruppo controllo
VI	Prove basate sull’opinione di esperti autorevoli o di comitati di esperti come indicato in linee guida o consensus conference, o basata su opinioni dei membri del gruppo di lavoro per la redazione delle linee guida

Materiale protetto da copyright

Forza delle raccomandazioni	
A	L'esecuzione di quella particolare procedura o prova diagnostica è fortemente raccomandata. Indica una particolare raccomandazione sostenuta da prove scientifiche di buona qualità, anche se non necessariamente di tipo I e II
B	Si nutrono dei dubbi sul fatto che quella particolare procedura o intervento debba sempre essere raccomandata, ma si ritiene che la sua esecuzione debba essere attentamente considerata
C	Esiste una sostanziale incertezza a favore o contro la raccomandazione di eseguire la procedura o l'intervento
D	L'esecuzione della procedura non è raccomandata
E	Si sconsiglia fortemente l'esecuzione della procedura

Piano Nazionale Linee Guida, Manuale metodologico, 2005

Abbreviazioni e registro dei vaccini

La libera circolazione dei vaccini all'interno della Unione Europea e al di fuori dell'Europa rende indispensabile una precisa codificazione per evitare, come sta avvenendo, una continua serie di errori. Una precisa denominazione per

Materiale protetto da copyright

tutti i vaccini in Europa e meglio nel mondo rappresenta una della facilitazioni basilari per chi esercita un'attività in questo settore.

Per esempio la combinazione classica dei vaccini contro difterite, tetano e pertosse viene abbreviata in modo assolutamente diverso da un Paese a un altro: DTP, DPT, DTC, DTK; inoltre al di fuori dell'Europa, ma anche all'interno di essa, vengono usati caratteri diversi da quello latino, come il greco, il cirillico, l'arabo. Quando poi al vaccino DTP venga aggiunto anche quello contro la polio, l'uso di un "P" crea una reale confusione perché esso può essere inteso come pertosse (c'è già un P) o come polio.

Per evitare errori, viene consigliato l'uso di un codice a tre lettere maiuscole (Maurer W, 2000). Successivamente l'ACIP (*Advisory Committee on Immunization Practices*), in accordo con il CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) e con il Pink Book, ha presentato un elenco delle abbreviazioni dei vaccini, che, con poche modifiche, è applicabile anche nel nostro Paese (*tabella 1.7*).

Tabella 1.7 Codice a lettere per indicare i vaccini in commercio in Italia

Materiale protetto da copyright

Nome del vaccino	Codice	Nome del vaccino	Codice
Colera		**Meningococco**	
Tossina DNA ricombinante + vibrioni inattivati	COL	Meningococco C coniugato	MCC
		Meningococco A, C, W135, Y polisaccaridico	MPSV4
Difterite, tetano, pertosse acellulare		**Papillomavirus umano**	
Anatossina tetanica	TT	Papillomavirus umano bivalente	HPV2
Anatossina difterica, tetanica per bambini	DT	Papillomavirus tetravalente	HPV4
Anatossina difterica, tetanica per adulti	dT		
Anatossina difterica, tetanica, pertosse acellulare per bambini	DTPa		
Anatossina difterica, tetanica, pertosse acellulare per adolescenti e adulti	dTpa		
DTPa + polio inattivato	DTPa-IPV		
DTPa + polio inattivato + Hib	DTPa-IPV-Hib		
DTPa + polio inattivato + Hib + Hep B	DTPa-IPV-Hib-HepB		
Encefalite giapponese		**Pneumococco**	
Virus inattivato	JEV	Pneumococco coniugato eptavalente	PCV7
		Pneumococco coniugato decavalente	PCV10
		Pneumococco coniugato 13-valente	PCV13
		Pneumococco polisaccaridico 23-valente	PPSV23
Febbre gialla		**Poliovirus**	
Virus attenuato	YF	Poliovirus trivalente inattivato	IPV
Haemophilus influenzae tipo b		**Rabbia**	
Haemophilus influenzae tipo b	Hib	Vaccino intero	RV
Epatiti		**Rotavirus**	
Epatite A	Hep A	Rotavirus monovalente	RV1
Epatite B	Hep B	Rotavirus pentavalente	RV5
Epatite A + epatite B	Hep A-Hep B		
Influenza		**Tifoidea, febbre**	
Monovalente pandemico H1N1 adiuvato	MIV	Antigene Vi	TIVI
Trivalente stagionale	TIV	Ty21A	TY21A
Morbillo, parotite, rosolia, varicella		**Tubercolosi**	
Morbillo-parotite-rosolia	MPR	Bacillo Calmette-Guérin	BCG
Varicella	VAR		
Morbillo-parotite-rosolia-varicella	MPRV		

Nel 1994 è stato creato presso l'OMS un **Registro delle Prove sui Vaccini**, utile per migliorare le conoscenze sugli studi sostenuti dall'OMS nel mondo. A dicembre 1999 erano stati inclusi 103 studi in 43 Paesi, di cui l'80% nei Paesi in via di sviluppo (Robertson SE et al, 2002).

Il numero delle ricerche si è andato estendendo anno dopo anno: da una media per anno di 3,9 nel periodo 1987–1993 a 10,7 per anno durante gli anni 1994–2000: negli anni dal 2001 al 2010 le ricerche sui vaccini sono aumentate in modo esponenziale.

Materiale protetto da copyright

Vaccini terapeutici

Negli ultimi anni gli sviluppi dell'area dei vaccini terapeutici sono stati rapidi e significativi.

Essi sono stati usati principalmente per il trattamento di vari tipi di cancro e molto più di rado in alcuni tipi di malattie infettive (HIV, micobatteri della tubercolosi e virus delle epatiti) (Dawson A, 2005). È risultato chiaro che i vaccini terapeutici possono essere particolarmente utili in alcune malattie infettive, nelle quali gli intenti farmacologici si siano dimostrati inefficaci o poco efficaci (Moingeon P et al, 2003).

Anche i vaccini terapeutici, come i vaccini preventivi, possono essere usati per stimolare il sistema immune a rispondere a un agente infettivo o a una malattia. Esistono tuttavia delle differenze fondamentali fra i vaccini preventivi, che vengono dati a tutta la popolazione con l'intenzione di prevenire una malattia particolare, in generale contagiosa, e i vaccini terapeutici che vengono dati a soggetti già infettati, come parte di un regime di cura di alcune specifiche malattie.

Mentre al momento attuale esistono molti vaccini per il trattamento di alcuni cancri, ne esistono pochi che siano stati utilmente impiegati

Materiale protetto da copyright

nella cura di alcune malattie infettive: è facile prevedere d'altra parte che essi saranno più numerosi in un prossimo futuro.

Bibliografia

Ada G., Isaac D. Carbohydrate-protein conjugate vaccines. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9:79–85.

Adu-Bobie J., Capecchi B., Serruto D. Two years into reverse vaccinology. *Vaccine*. 2003;21:605–610.

Andrews N., Miller E., Grant A., et al. Thimerosal exposure in infants and developmental disorders: a retrospective cohort study in the United Kingdom does not support a causal association. *Pediatrics*. 2004;114:584–591.

Assael B. Il vaiolo tra scienza e storia. In *Il favoloso innesto. Storia sociale della vaccinazione*. Bari: Laterza; 1995. pp. 11–67

Barone M. *La sperimentazione clinica in vaccinologia*. Firenze: Novartis; 2008. 8 febbraio

Bartolozzi G. Il vaccino contro l'Hib, i prioni e la "mucca pazza". *Medico e Bambino*. 1997;16:329–330.

Bartolozzi G., Longo G. Thimerosal, allergia all'aspirina e vaccini. *Medico e Bambino*. 1996;15:115–116.

Bartolozzi G., Urbano P. La prevenzione contro meningococco, pneumococco ed Haemophilus influenzae. *tipo b. Medico e Bambino*. 1996;15:607–609.

Bauman M.L., Kemper T.L. The neuropathology of the autism spectrum disorders: what have we learned? *Novartis Founds Symp*. 2003;251:112–122.

BenMohamed L., Weshsler S.L., Nesburn A.B. Lipopeptide

Materiale protetto da copyright

vaccines – yesterday, today and tomorrow. *Lancet Infect Dis*. 2002;2:425–431.

Blanchard Rohner G., Snape M.D., Kelly D.F., et al. The magnitude of the antibody and memory B cell responses during priming with a protein-polysaccharide conjugate vaccine in human infants is associated with the persistence of antibody and the intensity of booster response. *J Immunol*. 2008;180:2165–2173.

Board on Health Promotion and Disease Prevention, Institute of Medicine. *Immunization safety review: Vaccines and autism*. National Academic Press; 2004.

Brugger S.A., Oesterreicher C., Hofmann H., et al. Hepatitis B virus clearance by transplantation of bone marrow fron hepatitis B immunised donor. *Lancet*. 1997;349:996–997.

CDC. General recommendations on immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR*. 1994;43(RR-1):1–38.

CDC. Blood and hair mercury levels in young children and women of childbearing age. United States, 1999. *MMWR*. 2001;50:94–97.

Chatellier G., Zapletal E., Lemaitre D., et al. The number need to treat: a clinically useful nomogram in its proper context. *BMJ*. 1996;312:426–429.

Commissione Nazionale per i Vaccini. *La questione dei conservanti a base di mercurio*. Piano Nazionale Vaccini; 2005. –2008

Clarkson T.W., Magos D.L., Myers G.J. The toxicology of mercury – Current exposure and clinical manifestations. *N Engl J Med*. 2003;349:1731–1737.

Materiale protetto da copyright

Currier J.R., Galley L.M., Wenschuh H., et al. Peptide impurities in commercial synthetic peptides and their implications for vaccine trial assessment. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15:267–276.

Davis M.M., Burtchart A.T., Coleman M.S., et al. The expanding vaccine development pipeline, 1995–2008. *Vaccine.* 2010;28:1353–1356.

Dawson A. Therapeutic vaccines: a solution to the prevention problem? *Vaccine.* 2005;23:2363–2366.

Delves P.J., Roitt I.M. The immune system (First of two parts). *N Engl J Med.* 2000;343:37–49.

Delves P.J., Roitt I.M. The immune system (Second of two parts). *N Engl J Med.* 2000;343:108–117.

De Vito C., Manzoli L., Marzuillo C., et al. A systematic review evaluating the potential for bias and the methodological quality of meta-analyses in vaccinology. *Vaccine.* 2007;25:8794–8806.

Ellis R.W. New technologies for making vaccines. *Vaccine.* 1999;17:1596–1604.

Gasparini R. Le vaccinazioni: storie di successi, problemi, un promettente futuro. In *8° Corso di Perfezionamento Vaccini e Strategie di Vaccinazione.* Firenze: Università degli Studi di Firenze. Dipartimento di Sanità Pubblica; 2008. marzo-aprile

Gomes Moriel D., Scarselli M., Serino L., et al. Genome-based vaccine development. *Human Vaccines.* 2008;4:184–188.

Gupta R.K. A need to review regulations for production and control of vaccines. *Vaccine.* 1997;15:1–2.

Gupta R.K., Alroy J., Alonso M.J., et al. Chronic local tissue reactions, long term immunogenicity and immunologic

Materiale protetto da copyright

priming of mice and guinea pigs to tetanus toxoid encapsulated in biodegradable polymer microspheres composed of poly lactide-co-glycolide polymers. *Vaccine*. 1997;15:1716–1723.

Heron J., Golding J., ALSPAC Study Team. Thimerosal exposure in infants and developmental disorders: a prospective cohort study in the United Kingdom does not support a causal association. *Pediatrics*. 2004;114:577–583.

Hilleman M.R. Six decades of vaccine development, a personal history. *Nat Med, Vaccine suppl*. 1998;4:507–514.

Hopp T.P. Immunogenicity of a synthetic HBsAg peptide: enhancement by conjugation to a fatty acid carrier. *Mol Immunol*. 1984;21:13–16.

Jacobson R.M. Promises and pitfalls of meta-analysis in vaccine research. *Vaccine*. 1999;17:1628–1634.

Jefferson T., Jefferson V. The quest for trials on the efficacy of human vaccines. Results of the handsearch of "Vaccine". *Vaccine*. 1996;14:461–464.

Katz S. Future vaccines and a global perspective. *Lancet*. 1997;350:1767–1770.

Kelly H., Attia J., Andrews R., Heller R.F. The number needed to vaccinate (NNV) and population extensions of the NNV: comparison of influenza and pneumococcal vaccine programmes for people aged 65 years and over. *Vaccine*. 2004;22:2192–2198.

Kelso J.N., Jones R.T., Yunginger J.W. Anaphylaxis to measles, mumps, and rubella vaccine mediated by IgE to gelatin. *J Allergy Clin Immunol*. 1993;91:867–872.

Knezevic I., Griffiths E., Reigel F., Dobbelaer R. Thiomerosal in vaccines: a regolatory perspective WHO

Materiale protetto da copyright